

Constanze Schmidmeier

Expression und Regulation der Calcitonin-Peptid-Familie in osteoblastären Zelllinien



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Expression und Regulation der Calcitonin-Peptid-Familie in osteoblastären Zelllinien

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Constanze Schmidmeier
aus Löbau

Gießen 2013

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie
Labor für experimentelle Unfallchirurgie
Direktor: Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. R. Schnettler
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Frau Prof. Dr. Lips
Gutachter: Herr Prof. Dr. Schlüter

Tag der Disputation: 24. September 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung und Fragestellung.....	1
2. Theoretischer Hintergrund	4
2.1. Die Calcitonin-Peptid-Familie	4
2.1.1. Calcitonin.....	4
2.1.2. Calcitonin Gene-Related Peptide.....	8
2.1.3. Amylin.....	9
2.1.4. Adrenomedullin.....	11
2.1.5. Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide	13
2.1.6. Intermedin	14
2.2. Die Rezeptoren der Calcitonin-Peptid-Familie	17
2.2.1. Calcitonin Rezeptor.....	18
2.2.2. Calcitonin Receptor-Like Receptor	21
2.2.3. Receptor Activity Modifying Protein.....	22
2.2.4. Receptor Component Protein	24
2.3. Hypoxie im Knochenstoffwechsel.....	25
3. Material und Methoden.....	27
3.1. Qualitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit MC3T3-E1 Zellen unter Normoxie-Bedingungen.....	27
3.1.1. Zellkultur	27
3.1.1.1. Die MC3T3-E1-Zelllinie	27
3.1.1.2. Verwendete Zellen	28
3.1.1.3. Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen.....	28
3.1.1.4. Kultivierung und Lagerung der MC3T3-E1-Zellen.....	28
3.1.1.5. Osteogene Differenzierung.....	29
3.1.2. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	30
3.1.2.1. RNA-Extraktion	31
3.1.2.2. cDNA-Synthese	31
3.1.2.3. RT-PCR	32
3.1.2.4. Gelelektrophorese	33
3.1.2.5. Verwendete Primer.....	34
3.2. Qualitative RT-PCR und real-time RT-PCR mit TE 85-Zellen unter Hypoxie-Bedingungen	35
3.2.1. Zellkultur	35
3.2.1.1. Osteosarkomzelllinie TE 85 (HOS).....	35
3.2.1.2. Verwendete Zellen	35
3.2.1.3. Standardbedingungen, Kultivierung und Lagerung der TE 85-Zellen.....	36
3.2.1.4. Inkubation der TE 85-Zellen unter Hypoxie-Bedingungen	37
3.2.2. Qualitative RT-PCR und real-time RT-PCR.....	38

3.2.2.1. RNA-Extraktion	38
3.2.2.2. Messung von Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA.....	38
3.2.2.3. cDNA-Synthese	39
3.2.2.4. Qualitative RT-PCR.....	39
3.2.2.5. Gelelektrophorese und Geldokumentation	39
3.2.2.6. Etablierung der Bedingungen und Primer für die real-time RT-PCR	40
3.2.2.7. Durchführung der real-time RT-PCR.....	43
3.2.2.8. Verwendete Primer.....	44
3.2.2.9. Auswertung der Ergebnisse der real-time RT-PCR	44
4. Ergebnisse.....	46
4.1. Qualitative RT-PCR mit MC3T3-E1-Zellen	46
4.1.1. Expression der molekularen Komponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in undifferenzierten und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen	46
4.2. Real-time RT-PCR mit TE 85-Zellen.....	50
4.2.1. Ergebnisse der real-time RT-PCR	50
5. Diskussion	53
5.1. Expression der molekularen Komponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in undifferenzierten und differenzierten MC3T3-E1-Zellen	53
5.1.1. Adrenomedullin.....	54
5.1.2. Intermedin	55
5.1.3. CGRP	56
5.1.4. CRLR	57
5.1.5. RAMP	58
5.2. Regulation von Adrenomedullin und Intermedin unter Hypoxie	60
5.2.1 Adrenomedullin.....	60
5.2.2. Intermedin	61
5.3. Ausblick	63
6. Zusammenfassung.....	64
7. Summary.....	65
8. Verzeichnisse	66
8.1. Literaturverzeichnis	66
8.2. Abbildungsverzeichnis.....	73
8.3. Tabellenverzeichnis.....	74
8.4. Abkürzungsverzeichnis	75
9. Erklärung zur Dissertation	77
10. Danksagung	78

1. Einleitung und Fragestellung

Das Knochengewebe als spezialisiertes Bindegewebe hat in unserem Körper neben Stabilisierungs- und Stützfunktionen vor allem den Schutz innerer Organe, des Zentralnervensystems und des hämatopoetischen Systems zur Aufgabe. Weiterhin besitzt es eine Vielzahl metabolischer Funktionen, wie die Speicherung von Kalzium und Phosphat.

Knochen setzt sich aus zwei Phasen zusammen: einer mineralischen Phase, die vor allem aus Hydroxylapatit besteht sowie einer organischen Matrix, deren Hauptbestandteil Kollagen vom Typ I ist.

Auch nachdem das Wachstum abgeschlossen ist, unterliegt das Knochengewebe ständig dynamischen Umbauvorgängen und weist im Allgemeinen gute Heilungstendenzen nach Verletzungen auf (Welsch, 2006b). Dieser stetige Auf- und Abbau ist auf verschiedene Zelltypen zurückzuführen, wobei vor allem die knochenbildenden Osteoblasten und die resorbierenden Osteoklasten für die Umgestaltung verantwortlich sind.

Osteoblasten entstehen aus mesenchymalen Progenitorzellen. Diese Vorläuferzellen entwickeln sich zunächst zu proliferierenden Präosteoblasten und später zu reifen Osteoblasten, welche Moleküle sezernieren, die einerseits mineralisierte Knochenmatrix bilden und andererseits Hämatopoese und Angiogenese fördern. Sie produzieren unter anderem Osteocalcin, RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand) und einen Rezeptor für Parathormon, wodurch sie in die Regulation von Knochenbildung und -resorption eingreifen können. Letztendlich entwickeln sich die reifen Osteoblasten zu mechanosensorischen Osteozyten, die in der Knochenmatrix eingeschlossen sind (Khosla et al., 2008).

Osteoklasten sind spezialisierte Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Ihre Vorläufer sind verwandt mit denen der Monozyten beziehungsweise Makrophagen und entstammen dem Knochenmark. Die Progenitorzellen proliferieren und differenzieren zunächst zu mononukleären Präosteoklasten und fusionieren später zu mehrkernigen Riesenzellen. Sie resorbieren mineralisierten Knochen durch Bildung von Resorptionsgruben, den sogenannten Howship-Lakunen (Suda et al., 1992). Reife Osteoklasten können auch in vitro gebildet werden. Neben der Monozyten-/Makrophagen-Fraktion des peripheren Blutes kommen dafür auch Knochenmarks- und Milzzellen infrage. Dieser Vorgang wird durch die Anwesenheit

von $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D₃ begünstigt (Takahashi et al., 1988). Osteoblasten und Stromazellen sind durch Zytokinausschüttung maßgeblich an der Entstehung von Osteoklasten beteiligt. Sie exprimieren den Differenzierungsfaktor RANKL aus der Familie der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Liganden. Osteoklastenvorläufer exprimieren wiederum RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB), einen TNF-Rezeptor, der bei Anwesenheit des Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF) zur Erkennung von RANKL führt. RANKL bewirkt sowohl die Differenzierung als auch die Aktivierung von Osteoklasten (Suda et al., 2001). Phänotypische Marker osteoklastärer Zellen sind beispielsweise der Calcitonin Rezeptor, die Tartrate-resistente saure Phosphatase (TRAP) und Integrin $\alpha v\beta 3$ (Lacey et al., 1998).

Die im Nachfolgenden beschriebene Calcitonin-Peptid-Familie stellt eine Gruppe strukturell eng verwandter Proteine dar, die an der Regulation vieler Stoffwechselprozesse im Körper beteiligt sind. Neben kardiovaskulären, renalen, pulmonalen, endokrinen und neuro-modulatorischen Wirkungen hat die Peptid-Familie auch Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Bei allen bisher entdeckten Proteinen dieser Gruppe – mit Ausnahme von Adrenomedullin – wurde eine knochenresorptive Wirkung nachgewiesen. Zusätzlich sind aber auch osteoproliferative Eigenschaften bekannt. So scheinen Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Amylin und Adrenomedullin Aktivatoren der Knochenbildung zu sein, welche das Knochenwachstum begünstigen. Über Intermedin als jüngstes Mitglied der Calcitonin-Familie und seine Wirkungen auf das Knochenwachstum liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. Ihre Wirkung entfalten die Peptide der Calcitonin-Familie über zwei verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche an der Zelloberfläche lokalisiert sind: den Calcitoninrezeptor (CTR) und den Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR). Zum Teil sind Receptor Activity Modifying Proteins, sogenannte RAMPs notwendig, damit die Peptide anbinden können (Naot and Cornish, 2008).

Bekannt ist weiterhin, dass es in der Lunge unter Hypoxie zu einer Induktion von Adrenomedullin und Intermedin kommt (Pfeil et al., 2009). Auch im Knochen können hypoxische Zustände eintreten. So führt beispielsweise eine Fraktur zur Unterbrechung der knochenversorgenden Blutgefäße. Die Folge sind eine verminderte Sauerstoffspannung und lokale Hypoxie.

Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis einzelner Mitglieder der Calcitonin-Familie sowie den entsprechenden Rezeptorkomponenten in der murinen osteoblastären Zelllinie MC3T3-E1. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Expression des CRLR, seine RAMPs und die darüber wirkenden Peptide gelegt: CGRP, Adrenomedullin und Intermedin.

Zusätzlich wurden auch Untersuchungen zur Regulation von Adrenomedullin und Intermedin unter Sauerstoffmangel in der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 durchgeführt.

Unter Berücksichtigung der erläuterten Hintergründe sollen in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragestellungen geprüft werden:

1. Werden Intermedin und CGRP in undifferenzierten und osteogen differenzierten Zellen der murinen osteoblastären Zelllinie MC3T3-E1 exprimiert?
2. Kann Adrenomedullin messenger Ribonukleinsäure (mRNA) nach osteogener Differenzierung in MC3T3-E1-Zellen nachgewiesen werden?
3. Finden sich die Rezeptorkomponenten CRLR und RAMP 1-3 im Anschluss an eine osteogene Differenzierung in MC3T3-E1-Zellen?
4. Werden Adrenomedullin und Intermedin in der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 unter dem Einfluss von Hypoxie reguliert?

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Die Calcitonin-Peptid-Familie

Die Calcitonin-Peptid-Familie besteht aus Calcitonin, alpha- und betaCalcitonin Gene-Related Peptide (α CGRP und β CGRP), Amylin, Adrenomedullin, den drei Calcitonin Receptor-Stimulating Peptides (CRSP 1-3) sowie Intermedin (Adrenomedullin 2) (Findlay and Sexton, 2004). Die Peptidfamilie ist dadurch charakterisiert, dass sie trotz unterschiedlicher Eigenschaften und Wirkmechanismen der Einzelkomponenten eine Reihe struktureller Ähnlichkeiten aufweist, welche die biologische Aktivität beeinflussen (Granholm, 2008).

Zunächst zeigen sich beim Vergleich der Primärstrukturen zum Teil beträchtliche Unterschiede. In der Aminosäuresequenz teilt beispielweise Amylin 20 % Homologie mit humanem Calcitonin und 46 % mit CGRP. Gleichzeitig weisen Adrenomedullin und CGRP eine Homologie von 24 % auf (Wimalawansa, 1997). Die Verwandtschaft der Peptide wird jedoch in der Sekundärstruktur deutlicher: Am N-terminalen Ende besitzen die Peptide einen Ring, der durch eine intramolekulare Disulfidbrücke gebildet wird. Diese Ringstruktur ist bedeutsam für Rezeptorinteraktionen. Ihr folgen eine amphipatische α -Helix und eine Prolin-Amid-Gruppe am C-Terminus (Granholm et al., 2011).

2.1.1. Calcitonin

Die Kalzium-senkende Wirkung des Calcitonins wurde erstmalig 1961 mittels Versuchen an Hunden nachgewiesen (Copp and Cameron, 1961). Copp und Cameron beschrieben Calcitonin als humoral kalzämischen Faktor, ordneten seine Herkunft jedoch zunächst den Nebenschilddrüsen zu. 1964 wurde herausgefunden, dass Calcitonin der Schilddrüse entstammt (Foster et al., 1964) und drei Jahre später konnten schließlich auch die für seine Bildung verantwortlichen Zellen ausfindig gemacht werden: die parafollikulären Zellen (Tauber, 1967). Heute ist bekannt, dass neuroektodermale Zellen, die der Neuralleiste

entstammen, bei Säugetieren in die Schilddrüse einwandern. Dort kommt es zur Herausbildung eines eigenen endokrinen Zelltyps, den parafollikulären Zellen. Diese sogenannten C-Zellen lagern basal im Schilddrüsenepithel. In der Ultrastruktur sind kleine, elektronendichte Sekretionsgranula nachweisbar, in denen Calcitonin gespeichert ist. Die Freisetzung erfolgt durch Exozytose und wird durch Kalziumsensoren gesteuert. Während eine Hyperkalzämie die Freisetzung fördert, ist Calcitonin bei niedrigem Kalziumspiegel im Blut kaum nachweisbar (Welsch, 2006a). Bei Wirbeltieren, die nicht der Gruppe der Säugetiere zuzuordnen sind, findet die Calcitoninbildung im ultimobranchialen Körper statt (Tauber, 1967).

In den Aminosäuresequenzen des Calcitonins gibt es zum Teil erhebliche Abweichungen zwischen einzelnen Spezies. So weisen Lachscalctonin und humanes Calcitonin beispielsweise nur 50 % Homologie auf (Houssami et al., 1995). Gemeinsam ist allen Sequenzen jedoch, dass sie aus 32 Aminosäuren bestehen und eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cysteinresten an den Positionen 1 und 7 sowie ein amidiertes Carboxylende (Prolinamid) besitzen (*Abbildung (Abb.) 1*).

Calcitonin verschiedener Spezies wird folgendermaßen klassifiziert: Man unterscheidet

- die Gruppe der Paarhufer, in die das Calcitonin von Schwein, Rind und Schaf gehört;
- die Gruppe der Nagetiere und Primaten, welche Ratten- und humanes Calcitonin einschließt und
- die Gruppe der Knochenfische und Vögel.

Im Hinblick auf die ausgelöste Hypokalzämie sinkt die biologische Potenz in absteigender Reihenfolge: Knochenfisch \geq Paarhufer \geq Mensch (Findlay and Sexton, 2004).

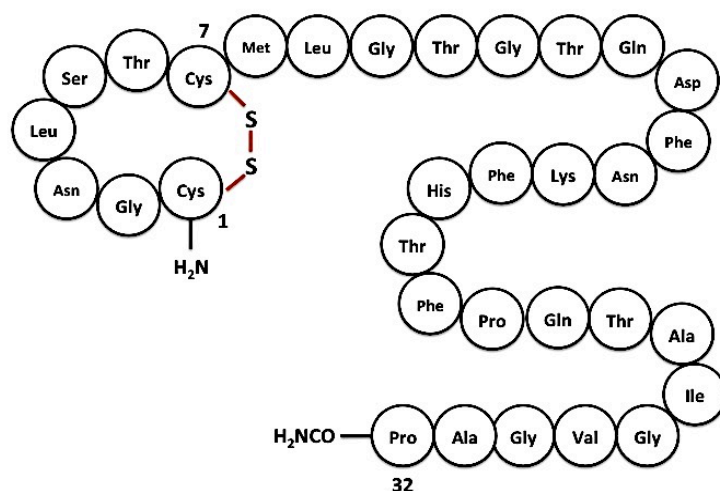


Abb. 1: Die Abbildung zeigt die Peptidstruktur des humanen Calcitoninmoleküls. Dargestellt ist eine intramolekulare Ringstruktur am N-terminalen Ende. Diese wird durch eine kovalente Bindung in Form einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen an Position 1 und 7 gebildet. Das Carboxylende ist amidiert (Prolinamid).

Calcitonin ist eng verwandt mit dem α CGRP. Beide werden auf dem CALCA-Gen, welches auf Chromosom 11 lokalisiert ist, codiert und sind somit auf ein gemeinsames primäres mRNA-Transkript zurückzuführen (Rosenfeld et al., 1983). Das CALCA-Gen erstreckt sich über 6,5 Kilobasen und wird vollständig transkribiert. Es besteht aus sechs Exons, wovon die ersten drei Exons in Calcitonin und CGRP mRNA gleich sind. Das vierte Exon enthält die Sequenzen für Calcitonin und Katalcalcin. Exon fünf und sechs enthalten die CGRP-Sequenz. Zellen, die Calcitonin produzieren, verbinden die Exons I-IV, während CGRP-bildende Zellen die Exons I-III, V und VI zusammenfügen (Breimer et al., 1988) (*Abb. 2a und b*).

Zunächst wird ein größeres Vorläuferprotein synthetisiert, welches noch 136 Aminosäuren lang ist. Durch gewebespezifisches alternatives Spleißen wird daraufhin in den C-Zellen der Schilddrüse vorwiegend Calcitonin gebildet, während in neuronalem Gewebe hauptsächlich der Neurotransmitter α CGRP produziert wird (Findlay and Sexton, 2004). β CGRP, das sich nur in einzelnen Aminosäuren vom α CGRP unterscheidet, wird auf einem separaten Gen produziert (Lerner, 2006). Das β -Gen (CALCB-Gen) befindet sich ebenfalls auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11. Es bildet zusammen mit dem CALCA-Gen den Calcitonin/CGRP-Gen-Komplex. Dieser ist zwischen den Genen für Katalase und Parathormon lokalisiert (Breimer et al., 1988).

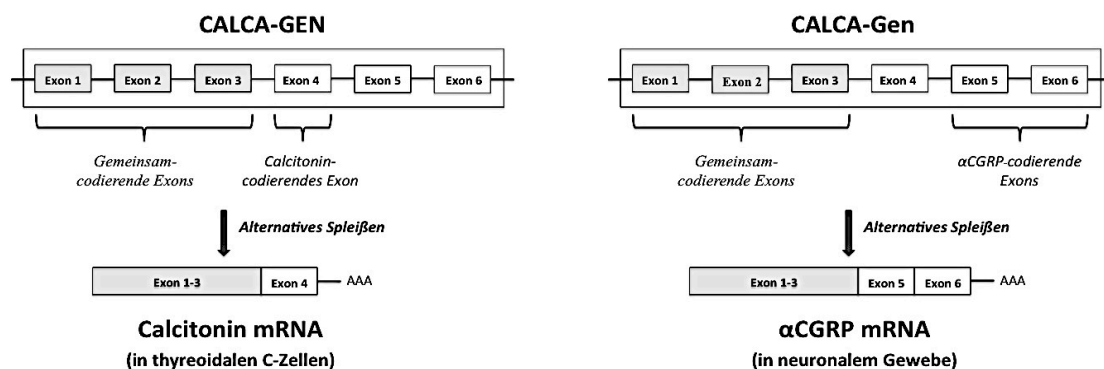


Abb. 2a: Die Abbildung zeigt die sechs Exons des CALCA-Gens. Für die Calcitonin mRNA, die in der Schilddrüse gebildet wird, werden die gemeinsam-codierenden Exons 1-3 sowie das Calcitonin-codierende Exon 4 verbunden.

Abb. 2b: Dargestellt ist das CALCA-Gen, aus dessen Exons im zentralen und peripheren Nervensystem α CGRP mRNA durch alternatives Spleißen entsteht. Dazu werden die gemeinsam-codierenden Exons 1-3 sowie die α CGRP-codierenden Exons 5 und 6 zusammengefügt.

Calcitonin stellt den physiologischen Antagonisten zum Parathormon dar. Bereits 1965 wurde vermutet, dass der durch Calcitonin verursachte hypokalzämische Effekt, hauptsächlich auf eine Hemmung der Knochenresorption zurückzuführen ist (Friedman and Raisz, 1965). Chambers und Magnus erkannten, dass es die zytoplasmatische Motilität in Osteoklasten bereits in sehr niedriger Konzentration aufhebt. Dieser Hemmeffekt ist reversibel und findet rezeptorvermittelt statt (Chambers and Magnus, 1982).

Trotz zahlreicher in vitro Experimente ist die physiologische Bedeutung von Calcitonin in vivo noch nicht vollständig geklärt. So stellt sich die Frage, warum Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom trotz unverhältnismäßig hoher Calcitoninspiegel eine normale Knochenstruktur aufweisen. Gleichzeitig gibt es keine Hinweise darauf, dass Patienten mit Zustand nach Thyreoektomie ohne endogene Calcitoninproduktion ein erhöhtes Risiko haben, eine Osteoporose zu entwickeln (Hurley et al., 1987; Granholm, 2008; Keller, 2010).

Erstaunliche Ergebnisse erbrachten Versuche mit Mäusen, die eine Deletion im CALCA-Gen hatten und dadurch sowohl Calcitonin- als auch α CGRP-defizient waren. Es wurde eine Verminderung der Knochenmasse durch Steigerung der Resorptionsrate erwartet. Stattdessen wurde bei diesen 3 Monate alten Mäusen eine erhöhte Knochenmasse infolge einer deutlich gesteigerten Knochenbildungsrate festgestellt (Hoff et al., 2002). Weitere Untersuchungen an CALCA-Knockout-Mäusen zeigten jedoch, dass altersabhängig auch eine Zunahme der Knochenresorption zu beobachten ist. Dies spricht für eine physiologische Bedeutung des Calcitonins als Hemmer der Osteoklastenfunktion im Mausmodell (Huebner et al., 2006; Granholm, 2008; Keller, 2010).

Kontrovers diskutiert wird die Wirkung des Peptidhormons auf die Fusion der Osteoklastenvorläufer und die Bildung von TRAP-positiven, multinukleären Zellen (Naot and Cornish, 2008). Cornish et al. untersuchten 2001 die Wirkung von Calcitonin auf Knochenmarkkulturen der Maus, welche mittels $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D3 zur Osteoklastenbildung stimuliert wurden. Calcitonin vermindert bei diesen Versuchen dosisabhängig die Zahl der TRAP-positiven, multinukleären Zellen, was darauf hindeutet, dass die Peptide der Calcitonin-Familie nicht nur reife Osteoklasten hemmen, sondern zusätzlich auch deren Entwicklung in Knochenmarkkulturen beeinflussen (Cornish et al., 2001). Eine kurzzeitige Calcitoninbehandlung von einer Stunde nahm in anderen Studien jedoch keinen Einfluss auf die Zahl multinukleärer TRAP-positiver osteoklastenartiger Zellen (Rakopoulos et al., 1995).

Neben der Wirkung auf den Knochenstoffwechsel führt Calcitonin auch in der Niere zu einer erhöhten Kalziumausscheidung durch Hemmung der tubulären Kalziumreabsorption. Es

steigert außerdem die Ausscheidungsrate von Natrium, Kalium, Phosphat, Chlorid und Magnesium im Urin und führt zu einer vermehrten Synthese von Vitamin D₃.

Im Zentralnervensystem vermittelt Calcitonin über zahlreiche Rezeptoren unter anderem analgetische Effekte sowie eine Appetitzügelung und Hemmung der Magensäuresekretion (Findlay and Sexton, 2004).

Therapeutisch wurde früher vor allem Lachscalitonin verwendet, da es sich im Vergleich zu humanem Calcitonin als 1000-fach stärker wirksam erwiesen hat. Es wurde hauptsächlich für die Behandlung von Erkrankungen verwendet, die mit übermäßiger Knochenresorption einhergehen, wie Osteoporose oder Morbus Paget. Die Wirksamkeit der Calcitoninbehandlung ist jedoch begrenzt, da sie zu einer Herunterregulation des CTR führt. Außerdem sind heute mit Bisphosphonaten effektivere Hemmer der Osteoklastenaktivität verfügbar, sodass Calcitonin nicht mehr als Mittel der ersten Wahl angesehen wird (Lerner, 2006).

2.1.2. Calcitonin Gene-Related Peptide

Rosenfeld et al. fiel 1981 bei der Untersuchung kultivierter Zelllinien aus dem medullären Schilddrüsenkarzinom der Ratte ein ständiger Wechsel von niedriger und hoher Calcitoninproduktion auf (Rosenfeld et al., 1981). Sie vermuteten, dass die Calcitonin mRNA dabei durch eine andere, längere mRNA ersetzt wurde. Desoxyribonukleinsäure (DNA)- und Ribonukleinsäure (RNA)-Analysen der neu entdeckten mRNA ergaben schließlich, dass sie ein 128 Aminosäuren langes Vorläufer-Polypeptid codierte. Dieses wiederum enthielt ein Spaltprodukt, bestehend aus 37 Aminosäuren, welches den Namen Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) bekam (Rosenfeld et al., 1983; Zaidi et al., 1987).

CGRP tritt in zwei Isoformen auf: α CGRP und β CGRP. Diese beiden Peptide unterscheiden sich in der Primärstruktur beim Menschen in drei und bei der Ratte sogar nur in einem einzigen Aminosäurerest. α CGRP wird zusammen mit Calcitonin auf ein und demselben Gen codiert. Durch alternatives Spleißen der mRNA können zwei stark unterschiedliche Peptide, die nur einzelne Aminosäurehomologien teilen, gewebespezifisch exprimiert werden. Während α CGRP im Nerven- und Gefäßsystem weit verbreitet ist, wird Calcitonin fast ausschließlich in der Schilddrüse gebildet. β CGRP wird im Gegensatz dazu auf einem eigenständigen Gen codiert. Es kommt in den Nervenfasern vieler Gewebetypen vor. Aus welchem Grund das Neuropeptid in den zwei verschiedenen Isoformen α CGRP und β CGRP exprimiert wird, ist derzeit noch unbekannt (Lerner and Persson, 2008).

CGRP gilt als Neuropeptid und wird hauptsächlich aus sensorischen Nervenfasern freigesetzt. Es agiert außerdem als potenter Vasodilatator, der vor allem die zerebrale Zirkulation beeinflusst und auch durch neuromodulatorische Prozesse eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Migräne zu spielen scheint (Brain and Grant, 2004; Raddant and Russo, 2011).

Im Knochenstoffwechsel wirkt CGRP durch Anbindung an Osteoblasten proliferativ. Schinke et al. zeigten 2004, dass α CGRP-defiziente Mäuse eine Osteopenie entwickeln, welche durch eine verminderte Knochenbildungsrate verursacht wird. Im Gegensatz dazu weisen Calcitonin/ α CGRP-defiziente Mäuse eine erhöhte Knochenmasse auf, was auf das Fehlen von Calcitonin zurückzuführen ist. Gleichzeitig sprechen diese Ergebnisse dafür, dass α CGRP einen Aktivator der Knochenbildung darstellt (Schinke et al., 2004; Granholm, 2008).

Außerdem führt auch CGRP, ähnlich wie Calcitonin und Amylin, zu einer zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängigen Motilitätshemmung in Osteoklasten (Naot and Cornish, 2008).

Cornish untersuchte 2001 auch die Wirkung von CGRP und Amylin auf TRAP-positive multinukleäre Zellen, welche mit $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D3 stimuliert wurden. Auch hier verminderte sich die Anzahl der osteoklastenartigen Zellen. Allerdings trat der Effekt im Gegensatz zu Calcitonin erst bei 1000-fach höheren Konzentrationen ein (Cornish et al., 2001).

2.1.3. Amylin

Westermarck isolierte 1986 Amyloidfibrillen aus einem Insulin-sezernierenden Tumor. Er erkannte, dass die N-terminale Aminosäuresequenz nicht dem Insulin ähnelte, sondern dass das Peptid stattdessen eine Homologie von 50 % mit CGRP teilte.

Auch Cooper beschrieb dieses Peptid mit einer Molekülmasse von 3905 Dalton als Hauptbestandteil von Amyloidablagerungen im Pankreas bei Typ-2-Diabetikern. Es handelte sich um die Entdeckung des Islet Amyloid Polypeptide (IAPP), welches heute meist Amylin genannt wird (Westermarck et al., 1986; Cooper et al., 1987).

Amylin ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptidhormon. Wie alle Vertreter der Calcitonin-Peptid-Familie besitzt es eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten sowie eine Amidgruppe am Carboxylende (Cooper, 1994). Es wird hauptsächlich in den Betazellen (β -Zellen) des Pankreas produziert und nach Nahrungsaufnahme

zusammen mit Insulin sezerniert (Lerner, 2006). Im Gegensatz zu Calcitonin und CGRP ist Amylin auf Chromosom 12 lokalisiert, von welchem jedoch angenommen wird, dass es sich um ein evolutionäres Duplikat des Chromosoms 11 handelt (Wimalawansa, 1997).

Die Hauptaufgabe des Amylins liegt in der Regulation des Glukosestoffwechsels. Seine Wirkung ist aber gegensätzlich zu der des Insulins. Versuche mit Skelettmuskeln der Ratte zeigten, dass Amylin die Glukoseaufnahme, den -transport und die Glykogensynthese hemmt, während Insulin diese Effekte fördert (Granholm, 2008; Westermark et al., 2011).

Im Hinblick auf eine kontrollierte Nährstoffaufnahme ins Blut führt Amylin außerdem zur Appetitzügelung und hemmt neben der Magenentleerung auch die Enzymsekretion des Pankreas sowie die Glukagonsekretion. Diese Hemmeffekte werden zentral gesteuert (Riediger et al., 1999). Hohe Amylinrezeptordichten fanden sich bei Versuchen mit Ratten in vielen Bereichen des Gehirns, vor allem im Hirnstamm und Teilen des Hypothalamus (Sexton et al., 1994).

Ähnlich dem Calcitonin induziert auch Amylin eine – wenngleich schwächere – Hypokalzämie durch Hemmung der Osteoklasten über einen cAMP-abhängigen Mechanismus.

Amylin stimuliert die Proliferationsrate in primären Rattenosteoblasten in vitro beträchtlich und zeigt ähnliche Effekte in humanen Osteoblasten. In vivo erhöht Amylin die Knochenbildungsrate. Dafür wurde Amylin auf die Calvariae adulter Mäuse über 5 Tage subkutan injiziert. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Knochenresorption sowie eine Zunahme des mineralisierten Knochenareals (Cornish et al., 1995). Bei systemischer Injektion in Mäusen erhöhten sich die histologischen Kennzeichen der Knochenbildung um 30-100 %, während die Resorptionsraten im Vergleich zur Kontrollgruppe um bis zu 70 % vermindert wurden (Cornish et al., 1998).

Auch Amylin scheint eine anzahlreduzierende Wirkung auf $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D3 stimulierte multinukleäre TRAP-positive Zellen zu haben. Der Effekt trat im Gegensatz zur Behandlung mit Calcitonin jedoch erst bei 1000-fach höheren Konzentrationen ein (Cornish et al., 2001).

In Bezug auf den Knochenstoffwechsel scheint Amylin dasjenige Peptid der Calcitonin-Familie mit der größten anabolen Wirkung zu sein (Naot and Cornish, 2008).

Therapeutisch werden Amylin-Analoga in der Diabetestherapie eingesetzt. In den Langerhans-Inseln diabetischer Patienten kommt es zu einem 1:100-Verhältnis von Amylin zu Insulin. Amylin ist in der Lage, unlösliche, regelmäßig angeordnete Fasern zu bilden. Obwohl das Peptidhormon in einer relativ geringen Gewebekonzentration auftritt, scheint es

durch Induktion der Apoptose eine Zerstörung der pankreatischen β -Zellen zu bewirken. Im Gegensatz zum Menschen besitzen Ratten und Mäuse eine leicht veränderte Primärstruktur des Proteins, was der Bildung der stabilen fibrillären Form des Amyloids vorbeugt. Die lösliche Form des Amylins wirkt sich nicht schädlich auf die β -Zellen aus. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse wurde ein humanes Amylin-Analogon entwickelt, welches die Insulin-freisetzung fördert (Adeghate and Kalasz, 2011).

2.1.4. Adrenomedullin

Kitamura et al. isolierten 1993 in Japan erstmals ein neues Peptid aus dem menschlichen Phäochromozytom. Es fiel auf, dass dieses Peptid die cAMP-Produktion in humanen Blutplättchen stimuliert und bei Ratten gleichzeitig eine potente und lang anhaltende Hypotension durch Vasodilatation der Widerstandsgefäße bewirkt. Da es sowohl beim Phäochromozytom als auch im normalen Nebennierenmark vorkommt, wurde es Adrenomedullin genannt (Kitamura et al., 1993a; Granholm, 2008).

Adrenomedullin ist ein Peptidhormon, das beim Menschen aus 52 Aminosäuren besteht. Als Vertreter der Calcitonin-Familie besitzt es einen Ring aus 6 Aminosäuren, der durch eine Disulfidbrücke zwischen der 16. und 21. Aminosäure geformt wird sowie einen C-terminalen amidierten Tyrosinrest (-CONH₂) (Kitamura et al., 1993a). Diese beiden Strukturen sind wichtig für die biologische Aktivität. Adrenomedullin₂₂₋₅₂, also der Teil des Moleküls, der keinen Ring enthält, ist selbst biologisch inaktiv. Er kann jedoch trotzdem an Adrenomedullin-Rezeptoren binden, wo er antagonistisch wirkt (Eguchi et al., 1994) (*Abb. 3*). Das humane Adrenomedullin-Gen wird dem Chromosom 11 zugeordnet. Es umfasst 4 Exons und 3 Introns (Ishimitsu et al., 1994). Adrenomedullin wird als Teil eines größeren Vorläufermoleküls synthetisiert. Dieses wird Präproadrenomedullin genannt und besitzt noch 185 Aminosäuren. Präproadrenomedullin besteht aus dem Proadrenomedullin und einem N-terminalen Signalpeptid. Das Proadrenomedullin wiederum ist ein amidiertes Peptid mit einer Länge von 20 Aminosäuren. Es bildet sowohl den Vorläufer des reifen Adrenomedullins als auch den eines weiteren verwandten Moleküls, dem Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide (PAMP) (Kitamura et al., 1993b).

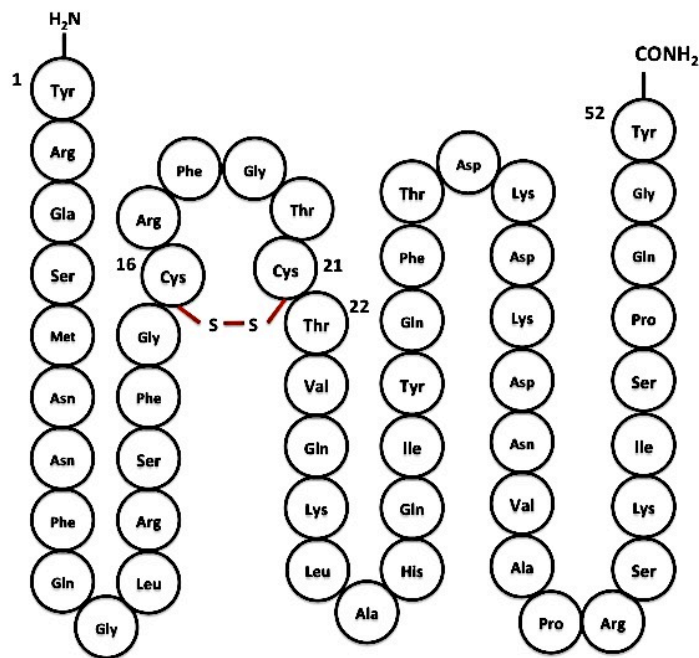


Abb. 3: Dargestellt ist die Primärstruktur des humanen Adrenomedullinmoleküls, bestehend aus 52 Aminosäuren. Die intramolekulare Ringstruktur befindet sich zwischen der 16. und 21. Aminosäure. Adrenomedullin₂₂₋₅₂ bildet den biologisch inaktiven Teil des Peptids und kann antagonistisch am Adrenomedullin-Rezeptor wirken.

Adrenomedullin liegt im Plasma in spezifisch gebundener Form vor. Dieses sogenannte Adrenomedullin-Bindungsprotein-1 entspricht dem Komplementfaktor H (Pio et al., 2001).

Da zirkulierendes Adrenomedullin sehr schnell verstoffwechselt wird, besitzt es eine kurze Halbwertszeit von 20 Minuten (min). Die Peptid-Clearance findet wahrscheinlich zum Großteil in der Lunge statt, wobei auch die Nieren an der Metabolisierung beteiligt sind. Adrenomedullin wird zunächst glomerulär filtriert und später durch die neutrale Endopeptidase, eine extrazelluläre, membrangebundene Zink-Metalloproteinase, die in vielen Geweben, insbesondere im Endothel und im Bürstensaum des proximalen Tubulus der Niere nachweisbar ist, gespalten und inaktiviert. Die Adrenomedullin-Konzentration im Urin ist etwa 15-mal höher als im Plasma. Es wird vermutet, dass dies weniger durch die Zirkulation im Blutkreislauf verursacht wird, sondern eher als Folge einer intrarenalen Produktion anzusehen ist (Beltowski and Jamroz, 2004).

Anfangs wurde davon ausgegangen, dass die Adrenomedullin-Synthese vor allem in Tumorzellen stattfindet. Weitere Studien zeigten jedoch, dass es physiologischer Weise, abgesehen von den hohen Konzentrationen im Nebennierenmark, beispielsweise auch in Herz, Lunge, Niere und verschiedenen Hirnarealen vorkommt. Außerdem wird es im Gefäßendothel und der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (Beltowski and Jamroz, 2004).

Als potenter Vasodilatator nimmt Adrenomedullin direkt Einfluss auf die systemische Zirkulation. Diese hämodynamischen Effekte werden über Rezeptoren an Endothelzellen und der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt. Neben kardiovaskulären Funktionen scheint Adrenomedullin unter anderem die Natriuresis zu beeinflussen, eine Bronchodilatation zu

bewirken und die Hormonfreisetzung aus Hypophyse und Pankreas zu fördern (Naot et al., 2001).

Unter hypoxischen Zuständen wird Adrenomedullin hochreguliert. Pfeil et al. zeigten, dass Sauerstoffmangel zu einer Steigerung der mRNA-Expression von Adrenomedullin in der murinen Lunge sowie in Endothelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten und Neuroblastomzellen führt (Pfeil et al., 2009).

Im Vergleich zu den restlichen Peptiden der Calcitonin-Familie scheint Adrenomedullin weder hypokalzämische Effekte noch eine Hemmung von Osteoklasten zu bewirken. Stattdessen stimuliert es wie Amylin die Proliferation von primären Osteoblasten der Ratte beträchtlich. Die subkutane Injektion von Adrenomedullin auf die Calvariae adulter Mäuse führt zu einer signifikanten Zunahme von Osteoid- und mineralisierten Knochenareal, was für eine Erhöhung der Knochenbildungsrate spricht (Cornish et al., 1997). 2001 wiesen Naot et al. die mRNA Expression von Adrenomedullin und seinen Rezeptoren in primären Osteoblasten der Ratte nach. Im Hinblick auf die mitogene Wirkung auf diese Zellen wird Adrenomedullin als lokaler Regulator des Knochenwachstums betrachtet, der scheinbar sowohl über autokrine als auch parakrine Mechanismen wirkt (Naot et al., 2001).

2.1.5. Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide

Bei dem Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide (CRSP) handelt es sich um ein erst kürzlich entdecktes weiteres Mitglied der Calcitonin-Familie. 2003 isolierten Katafuchi et al. ein neues Peptid aus Hirnextrakt des Schweins, welches hauptsächlich im Zentralnervensystem und der Schilddrüse exprimiert wird. Bei Aminosäuresequenzanalysen von CRSP und seinen Vorläuferproteinen zeigte sich eine signifikante Homologie von 60 % zum CGRP (Katafuchi et al., 2003b). Kurze Zeit später wurden zwei weitere verwandte Peptide mittels Klonierung komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) identifiziert und die CRSPs entsprechend als CRSP 1, CRSP 2 und CRSP 3 benannt (Katafuchi et al., 2003a).

CRSP-Gene wurden in Säugetieren wie Schweinen oder Hunden gefunden, nicht jedoch in Primaten und Nagern (Granholm, 2008; Katafuchi et al., 2009).

CRSP 1 besteht aus 38, CRSP 2 und 3 jeweils aus 37 Aminosäuren. Alle besitzen am Aminoende eine durch eine Disulfidbrücke gebildete Ringstruktur zwischen zwei Cysteinresten und ein amidiertes Carboxylende (Katafuchi and Minamino, 2004).

Die drei Peptide weisen jedoch unterschiedliche Rezeptoraffinitäten auf. So stimuliert nur

CRSP 1 die cAMP-Produktion in CTR exprimierenden Zellen, während CRSP 2 und 3 keine Affinität zu den bekannten Rezeptoren der Calcitonin-Familie zeigen (Lerner, 2006).

Bei mRNA-Untersuchungen stellte sich heraus, dass CRSP vor allem in Schilddrüse, Mittelhirn, Hypothalamus und Hypophyse exprimiert wird. Eine schwächere Expression wurde jedoch auch in peripheren Geweben wie Lunge, Leber, Dünndarm, Nebenniere und Ovarien beobachtet (Granholm et al., 2011).

Bei Ratten senkt eine CRSP-Gabe den Kalziumspiegel im Blut. In dieser Eigenschaft ähnelt es dem Calcitonin. Auf den Blutdruck hat CRSP im Gegensatz zu CGRP allerdings keine Wirkung (Katafuchi et al., 2003b). Der Minderung des Serumkalziums könnte eine Aktivierung des CTRs zugrunde liegen. Es wurde außerdem gezeigt, dass CRSP 1 in renalen Epithelzellen die cAMP-Bildung stimuliert, die Kalziumaufnahme vermindert und die Proliferation hemmt (Granholm et al., 2011).

Noyota et al. untersuchten die Wirkung von CRSP 1 auf die Osteoklastenentwicklung. CRSP 1 vermindert die Bildung von multinukleären Osteoklasten in M-CFS und RANKL stimulierten Knochenmarkzellen und in $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D₃ stimulierten Milz- und Stromazellen (Notoya et al., 2007). CRSP führt zu einer reversiblen Hemmung der Knochenresorption in der Calvaria der Maus. Zusätzlich wirkt es hinderlich auf die Osteoklastenentstehung in einem späten Stadium ihrer Entwicklung (Granholm et al., 2011).

2.1.6. Intermedin

2004 gelang es Roh et al. mittels Genomanalysen des Menschen und anderer Wirbeltieren ein weiteres Mitglied der Calcitonin-Peptid-Familie zu finden, genannt Intermedin. Dieses Peptid wurde reichlich in der Intermediärzone der Hypophyse exprimiert. Auffällig war eine Homologie von 28 % gegenüber Adrenomedullin und 20 % mit CGRP (Roh et al., 2004). Zeitgleich entdeckten auch Ogoshi et al. ein Peptid bei cDNA-Analysen des Kugelfisches und gaben ihm den Namen Adrenomedullin 2 (Ogoshi et al., 2003). Die Tatsache, dass beide Peptide dieselbe Primärstruktur besaßen und ähnliche biologische Effekte hervorriefen, führte zu der Überzeugung, dass es sich bei Intermedin und Adrenomedullin 2 um dasselbe Molekül handelte (Bell and McDermott, 2008).

Mittels Genomanalysen wurde das Intermedin-Gen bei der Maus auf dem Chromosom 15 und beim Menschen auf dem distalen Arm des Chromosoms 22q13 gefunden. Damit unterscheidet sich Intermedin von allen anderen Peptiden der Calcitonin-Familie, deren Geneloci auf den

Chromosomen 11 und 12 verteilt sind (Roh et al., 2004).

Intermedin wird zunächst als 148 Aminosäuren langes Vorläuferprotein mit einem Signalpeptid am N-terminalen Ende synthetisiert. Durch proteolytische Spaltung dieses Vorläuferproteins entsteht die lange Form des Intermedinmoleküls, bestehend aus 47 Aminosäuren (Intermedin₁₋₄₇). Dieses kann auch in eine kürzere Peptidform aus 40 Aminosäuren weiterverarbeitet werden (Intermedin₈₋₄₇).

Intermedin teilt ebenfalls strukturelle Merkmale, die charakteristisch für die Calcitonin-Familie sind. So besitzt es einen N-terminalen Ring aus 6 Aminosäuren und eine Disulfidbrücke, gefolgt von einer α -Helix-Region. Das Carboxylende ist amidiert (Roh et al., 2004; Granholm, 2008) (Abb. 4).

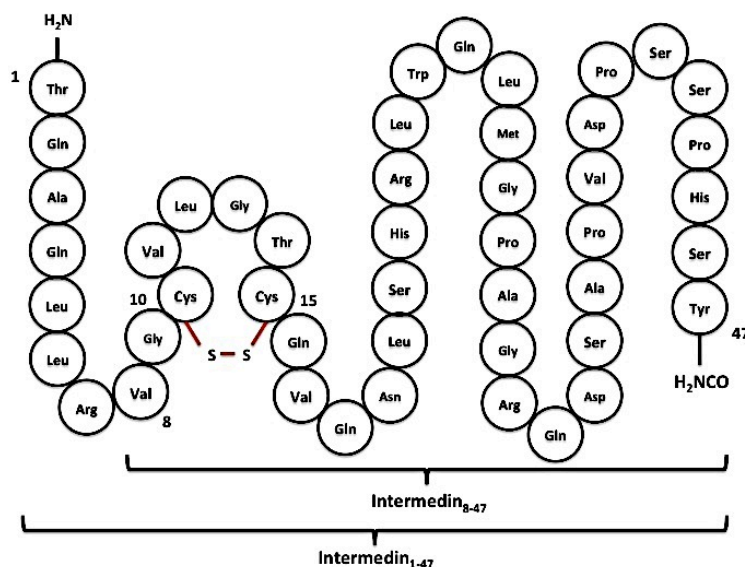


Abb. 4: Die Abbildung stellt die Aminosäuresequenz des humanen Intermedinmoleküls dar. Nach proteolytischer Spaltung eines Vorläuferproteins tritt das Peptid in einer längeren (Intermedin₁₋₄₇) und einer kürzeren Form (Intermedin₈₋₄₇) auf. Beide Varianten enthalten ein amidiertes Carboxylende und die typische Ringstruktur, welche aus 6 Aminosäuren besteht.

Intermedin wird in vielen Organen exprimiert. Zunächst beschrieben Roh et al. Intermedin vornehmlich in der Hypophyse und im Gastrointestinaltrakt (Roh et al., 2004). Taylor et al. wiesen es kurze Zeit später in Herz, Lunge, Magen, Niere, Hypophyse und Gehirn der Ratte nach (Taylor et al., 2005). Auch im menschlichen Körper finden sich hohe Konzentrationen in Hypothalamus und Hypophyse sowie dem Myokard und den Tubuluszellen der Niere (Takahashi et al., 2006).

Im Hinblick auf die physiologischen Wirkungen des Intermedins zeigen sich Parallelen zu CGRP und Adrenomedullin. So beeinflusst auch Intermedin Herzfrequenz und Blutdruck (Ren et al., 2006). Es führt weiterhin zu einer Suppression der Magenentleerung sowie zu verminderter Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme (Roh et al., 2004; Taylor et al., 2005). Eine Intermedingabe resultiert bei Ratten auch in einer gesteigerten Prolaktinfreisetzung (Lin

Chang et al., 2005; Granholm, 2008).

In der Lunge wird Intermedin durch Hypoxie induziert. Pfeil et al. untersuchten 2009 die Expression von Intermedin in hypoxischen Zuständen und seinen Einfluss auf die Gefäßpermeabilität. Sie zeigten, dass eine reduzierte Sauerstoffkonzentration zu einer vermehrten Expression von Intermedin in der murinen Lunge und in pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen führt. Es dient der Stabilisierung des Gefäßendothels und dadurch der Verbesserung der pulmonalen Barrierefunktion (Pfeil et al., 2009).

Es war lange nichts über die Auswirkungen des Intermedins auf den Knochenstoffwechsel bekannt. Granholm et al. wiesen 2011 an Calvariaknochen der Maus nach, dass Intermedin die Knochenresorption in vitro hemmt. Es geschieht wie bei den anderen Peptiden der Calcitonin-Familie, ausgenommen Adrenomedullin, durch eine direkte Aktivitätshemmung reifer Osteoklasten. Dieser Effekt ist reversibel. Weiterhin wurde gezeigt, dass Intermedin die Osteoklastenentstehung in einem späten Entwicklungsstadium hemmt und die Osteoklastenbildung vermindert (Granholm et al., 2011).

2.2. Die Rezeptoren der Calcitonin-Peptid-Familie

Die Peptide der Calcitoninfamilie entfalten ihre Wirkung mittels zweier G-Protein (Guanynukleotid-bindendes Protein) gekoppelter Rezeptoren. Man unterscheidet den Calcitoninrezeptor (CTR) und den Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR). Es handelt sich dabei um Oberflächenrezeptoren, welche die Zellmembran mit sieben Transmembrandomänen durchspannen. Sie teilen eine Sequenzhomologie von etwa 50 % (Fischer et al., 2002). Während Calcitonin allein über den CTR wirkt, benötigen CGRP, Amylin und Adrenomedullin eines von drei Receptor Activity Modifying Proteins (RAMP) um an ihre jeweiligen Rezeptoren anbinden zu können. Dabei wird die Spezifität dieser Rezeptoren durch Heterodimere zwischen einem G-Protein gekoppelten Rezeptor und einem der verschiedenen RAMPs bestimmt (Lerner, 2006) (Abb. 5).

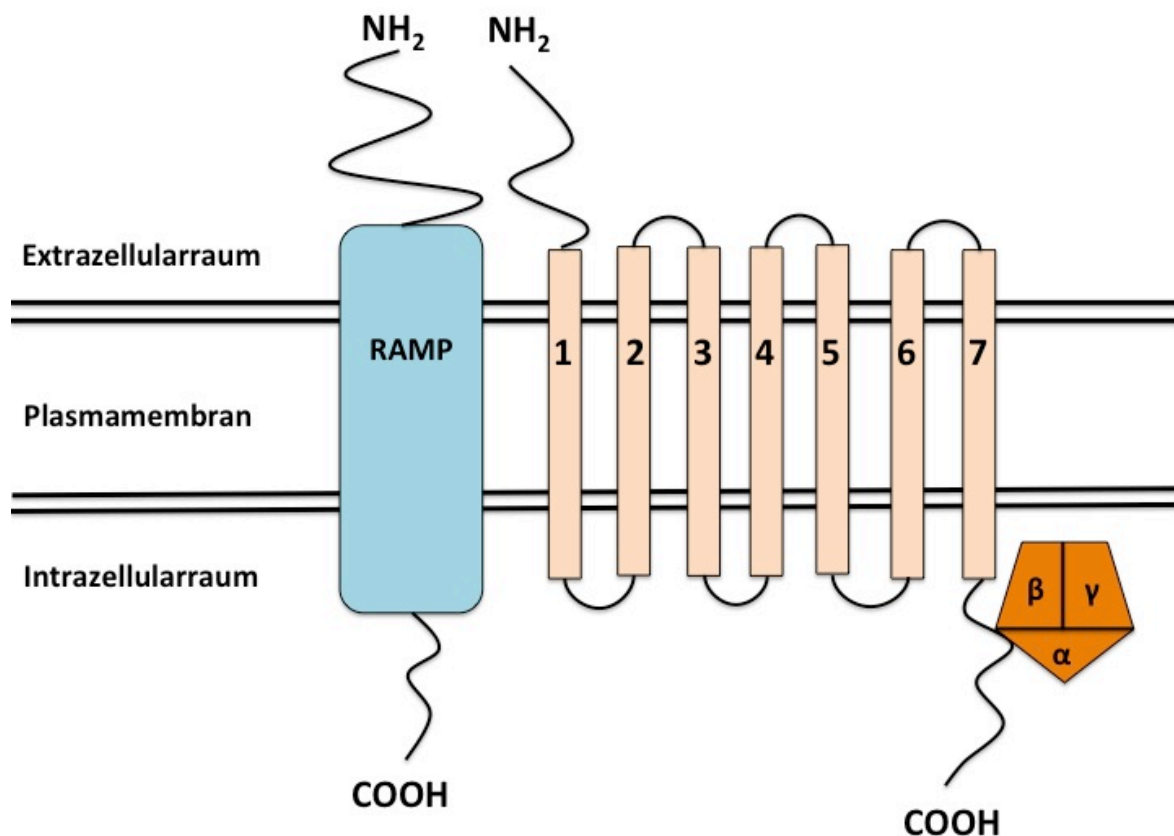


Abb. 5: Dargestellt ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, bestehend aus sieben Transmembrandomänen. Er ist in der Plasmamembran verankert. Das Aminoende befindet sich dabei extrazellulär, während das Carboxylende im Zytosol liegt. Das G-Protein ist aus drei Untereinheiten aufgebaut. Bei RAMP handelt es sich um ein Einzel-Transmembranprotein.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren übertragen die von einem extrazellulären Liganden ausgelöste Konformationsänderung an G-Proteine, mit denen sie verbunden sind und welche die Aktivierung eines intrazellulären Enzyms übernehmen (Horn et al., 2005).

G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, der α -, β - und γ -Untereinheit. Im Ruhezustand ist Guanosindiphosphat (GDP) an das G-Protein gebunden. Bei Rezeptorbindung wird GDP durch energiereicheres Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht. Dadurch kommt es zur Aktivierung der α -Untereinheit, welche sich daraufhin von der $\beta\gamma$ -Untereinheit trennt. Die α -Untereinheit ist jetzt in der Lage, Enzyme zu aktivieren, die wiederum intrazelluläre second messenger synthetisieren (Huppelsberg and Walter, 2005).

2.2.1. Calcitonin Rezeptor

Der Calcitonin Rezeptor (CTR) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, bestehend aus sieben Transmembrandomänen. Er wurde zuerst 1991 von Lin et al. durch Expressionsklonierung einer Nierenepithelzelllinie von Schweinen identifiziert. Dieser Rezeptor besteht aus 482 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 55 Kilodalton (Lin et al., 1991). Kurz darauf wurde auch der menschliche CTR geklont (Goldring et al., 1993).

Der CTR gehört in die Klasse II der G-Protein gekoppelten Rezeptoren und weist eine enge Verwandtschaft auf zu den Rezeptoren für Parathormon und Parathormon related Peptide, Sekretin, Vasoaktives Intestinales Peptid, Growth Hormone Releasing Hormon, Glukagon-like Peptid-1 und Glukagon, Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide und Gastric Inhibitory Peptide (Findlay and Sexton, 2004).

Das humane CTR-Gen befindet sich auf Chromosom 7. Es existieren sowohl bei Menschen als auch bei Nagetieren multiple Rezeptorisoformen, welche durch alternatives Spleißen aus einem primären mRNA-Transkript entstehen. Dieser Mechanismus beeinflusst die Rezeptorfunktion insofern, als dass die anbindenden Peptide unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Isoformen aufweisen (Findlay and Sexton, 2004).

Der CTR wird auf reifen Osteoklasten zahlreich exprimiert (Nicholson et al., 1986). Er findet sich jedoch noch nicht auf den frühen Osteoklastenvorläuferzellen, da die Expression von CTR erst in einem späten Stadium der Osteoklastenentwicklung eintritt (Lerner, 2006). Osteoklasten exprimieren hauptsächlich die CTR-Isoform C1a, zum Teil jedoch auch C1b (Pondel, 2000).

In der Literatur gibt es Hinweise dafür, dass es auch auf einzelnen osteoblastären Zelllinien zu einer Expression des CTR kommen kann. Trotzdem weisen die meisten bisher untersuchten Osteoblasten und Stromazellen keinen CTR auf (Lerner, 2006).

Der CTR kann zellspezifisch an unterschiedliche G-Proteine binden. Bei Interaktion mit G_s wird die Adenylatcyclase stimuliert und es kommt zur Erhöhung der Konzentration an cAMP in der Zelle. cAMP bewirkt wiederum die Aktivierung der Proteinkinase A, welche daraufhin weitere Funktionsproteine phosphoryliert (Abb. 6). So findet beispielsweise die Calcitonin-bedingte Hemmung der Knochenresorption in Osteoklasten über einen Proteinkinase A gesteuerten Mechanismus statt. Bei Induktion eines G_i -Proteins wird durch Hemmung der Adenylatcyclase der gegenteilige Effekt herbeigeführt (Findlay and Sexton, 2004; Keller, 2010).

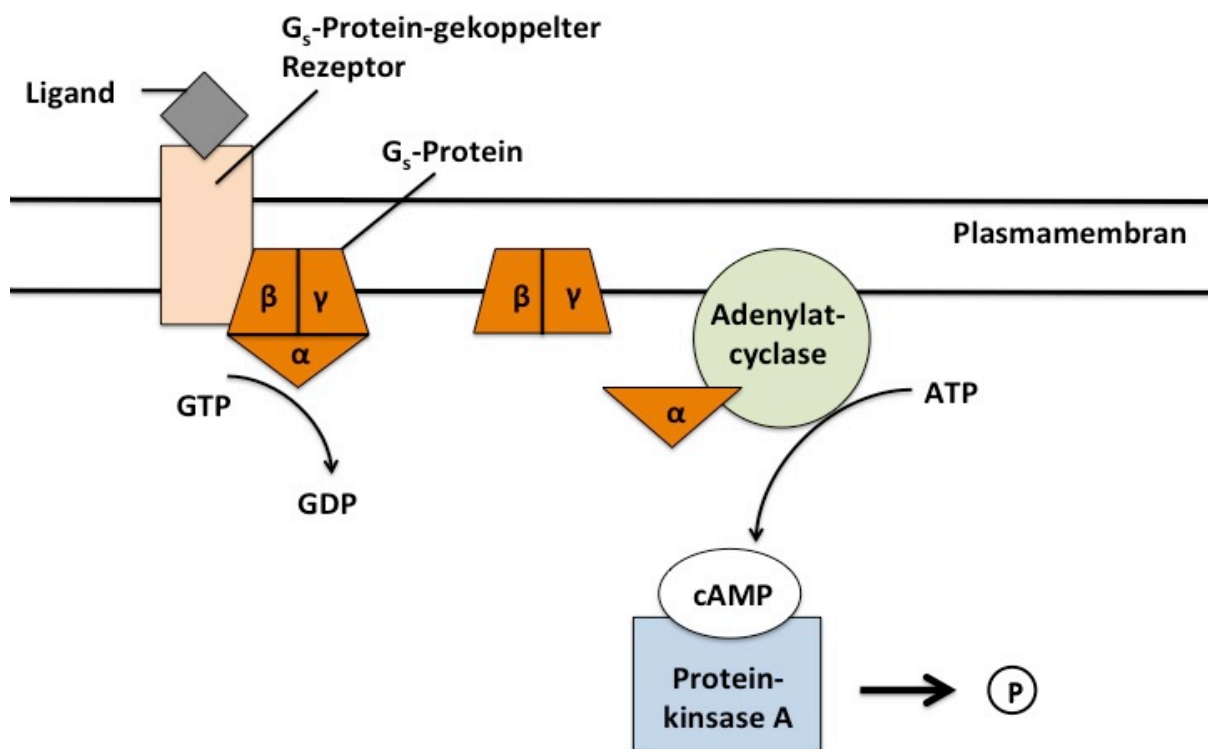


Abb. 6: Die Abbildung stellt den Signaltransduktionsweg über die Adenylatcyclase dar. Das G_s -Protein besteht aus 3 Untereinheiten. Bei Ligandenbindung dissoziiert die α -Untereinheit mit Hilfe von GTP ab und induziert die cAMP-Bildung durch die Adenylatcyclase. cAMP aktiviert die Proteinkinase A und führt damit zur Phosphorylierung weiterer Funktionsproteine.

Eine weitere Möglichkeit ist die Anbindung des CTR an ein G_q -Protein, wodurch die Phospholipase C aktiviert wird. Diese spaltet ihrerseits Phospholipide der Zellmembran in die second messenger Inositol-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 setzt daraufhin intrazelluläres Kalzium frei, welches zusammen mit DAG zur Aktivierung der Proteinkinase C führt (Findlay and Sexton, 2004) (Abb. 7).

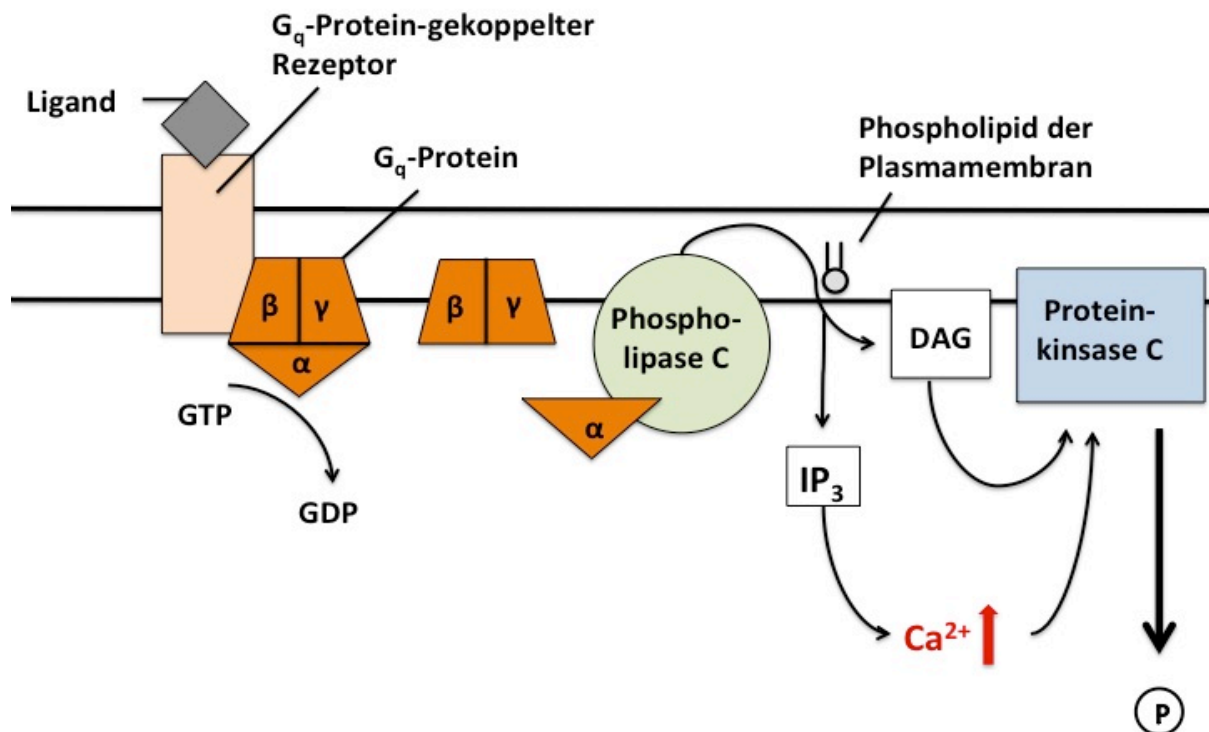


Abb. 7: Die Abbildung zeigt die Signaltransduktion über die Phospholipase C. Bindet ein Ligand an den G_q -Protein gekoppelten Rezeptor, so aktiviert die α -Untereinheit die Phospholipase C zur Spaltung eines Phospholipids der Plasmamembran. Dabei entsteht auch IP_3 , welches die Kalziumkonzentration im Zytoplasma erhöht. DAG aktiviert nun mit Hilfe des freigewordenen Kalziums die membrangebundene Proteinkinase C.

Wird der CTR durch Calcitonin aktiviert, kommt es zur schnellen Herunterregulation des Rezeptors. Lerner sieht in diesem Mechanismus einen möglichen Grund dafür, weshalb die Hemmung der Knochenresorption durch Calcitonin nur von vorübergehender Dauer ist (Lerner, 2006).

2.2.2. Calcitonin Receptor-Like Receptor

Der Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) wurde zuerst 1993 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander in Ratten identifiziert (Chang et al., 1993; Njuki et al., 1993). 1995 konnte er durch cDNA-Klonierung im Kleinhirn auch bei Menschen nachgewiesen werden (Fluhmann et al., 1995).

Der CRLR wird der Klasse II der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zugerechnet. Er wurde inzwischen in verschiedenen Spezies gefunden, unter anderen in Kuh, Schwein, Maus und Flunder. Allerdings wurden im Gegensatz zum CTR bisher keine Rezeptor-Isotypen innerhalb dieser Spezies entdeckt (Born et al., 2002).

Der humane CRLR besteht aus 461 Aminosäuren und ist eng verwandt mit dem CTR, mit welchem er eine Sequenzhomologie von 56 % teilt. Zunächst konnte allerdings kein passender Ligand für den CRLR gefunden werden, sodass man ihn initial als „Waisenrezeptor“ bezeichnete. Es wurde davon ausgegangen, dass er zu einem bis dahin unbekannten Liganden gehöre, der homolog zu Calcitonin, CGRP, Amylin und Adrenomedullin ist (Fluhmann et al., 1995).

Im Gegensatz zum CTR, der die Fähigkeit besitzt, eigenständig als potenter Calcitoninrezeptor zu agieren, benötigt der CRLR jedoch die Unterstützung eines RAMP, um zunächst zur Zellmembran transportiert zu werden und später Liganden binden zu können (Naot and Cornish, 2008). Dimerisiert der CRLR mit einem der drei RAMPs, so verändert sich seine terminale Glykosylierung (Morfis et al., 2003). CRLR kann sowohl als Adrenomedullin- wie auch als CGRP-Rezeptor dienen. Die Spezifität der Liganden hängt allein davon ab, mit welchem der verschiedenen RAMPs er interagiert (Lerner, 2006).

CRLR wird hauptsächlich in Herz, Lunge und Nieren exprimiert (Fluhmann et al., 1995). mRNA und Protein wurden jedoch auch in der MC3T3-E1-Zelllinie sowie in Osteoblasten der Calvariae von Mäusen und Ratten entdeckt. Uzan et al. berichteten, dass eine Behandlung von MC3T3-E1-Zellen mit Dexamethason eine verminderte Expression von CRLR zur Folge hat (Uzan et al., 2004). Nakamura et al. konnten eine CRLR mRNA-Expression außerdem in Osteoklasten nachweisen (Nakamura et al., 2005; Lerner, 2006).

2.2.3. Receptor Activity Modifying Protein

Die Receptor Activity Modifying Proteins (RAMPs) wurden 1998 entdeckt. McLatchie et al. zeigten, dass es bei Co-Expression von RAMP 1 und CRLR zur Bildung eines Rezeptors kommt, welcher dem CGRP-Rezeptor in der humanen Neuroblastomazelllinie SK-N-MC gleicht (McLatchie et al., 1998). Auf der Suche nach weiteren RAMP 1 ähnlichen Sequenzen wurden mit Hilfe von Gendatenbanken schließlich auch RAMP 2 und RAMP 3 detektiert (Naot and Cornish, 2008).

Bei RAMP 1 handelte es sich um ein Einzel-Transmembranprotein, bestehend aus 148 Aminosäuren (Morfis et al., 2003). Während RAMP 1 beim Menschen auf Chromosom 2 lokalisiert ist, befindet sich RAMP 2 auf Chromosom 17 und RAMP 3 auf Chromosom 7 (Born et al., 2002). Diese drei bisher gefundenen RAMPs teilen zwar nur etwa 30 % Sequenzhomologie, besitzen jedoch eine ähnliche Grundstruktur. Sie bestehen aus einer sehr großen extrazellulären Domäne am Aminoende, in welche 4 Cysteinreste eingeschlossen sind. Zusätzlich verfügen sie über eine einzelne Transmembrandomäne und einen kurzen C-Terminus, der ins Zytoplasma ragt (Naot and Cornish, 2008). Welche Funktion diese Domänen im Einzelnen haben, ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass der Ligand mit Hilfe der N-terminalen Region erkannt wird. Die Transmembrandomäne stabilisiert den gesamten Rezeptorkomplex, während das Carboxylende die intrazelluläre Signalkaskade zu beeinflussen scheint (Granholm et al., 2008).

Eine Hauptaufgabe der RAMPs liegt wahrscheinlich in der Glykosylierung von CRLR. Dadurch wird der Transport des Rezeptors zur Zellmembran ermöglicht. Da RAMPs sowohl mit CRLR als auch mit CTR dimerisieren, tragen sie zur Bildung unterschiedlicher Rezeptoren für die Peptide der Calcitonin-Familie bei (Lerner, 2006). So formen CRLR und RAMP 1 den Rezeptor für CGRP. CRLR kann in Verbindung mit RAMP 2 oder 3 jedoch auch als Adrenomedullin-Rezeptor dienen (Granholm et al., 2011). Intermedin interagiert ebenfalls mit CRLR, allerdings nichtselektiv, das heißt sowohl mit RAMP 1, 2 und 3 (Roh et al., 2004). CTR bildet zusammen mit den RAMPs Amylin-Rezeptoren, die wiederum auch eine gewisse Affinität zu CGRP aufweisen. CRSP wirkt ebenfalls über den CTR, zeigt jedoch keinen Effekt an Adrenomedullin-, CGRP- oder Amylin-Rezeptoren (Granholm et al., 2011) (*Tabelle (Tab.) 1*).

Rezeptor	Rezeptorkomponenten	Liganden
CTR	CTR	Calcitonin, CRSP
AMY ₁	CTR + RAMP 1	Amylin, CGRP
AMY ₂	CTR + RAMP 2	Amylin, CGRP
AMY ₃	CTR + RAMP 3	Amylin, CGRP
CGRP ₁	CRLR + RAMP 1	CGRP, Intermedin
ADM ₁	CRLR + RAMP 2	Adrenomedullin, Intermedin
ADM ₂	CRLR + RAMP 3	Adrenomedullin, Intermedin

Tab. 1: Rezeptoren der Calcitonin-Peptid-Familie mit den einzelnen Rezeptorkomponenten und den entsprechenden Liganden.

Die RAMPs werden ubiquitär exprimiert, sogar in Geweben, in denen weder CTR noch CRLR vorkommen (Lerner, 2006). Abgesehen von den genannten können die RAMPs auch mit anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren dimerisieren und zusammenspielen (Naot and Cornish, 2008).

Die RAMPs wurden unter anderem in Knochenzellen gefunden (Lerner, 2006). In Calvaria-Osteoblasten der Maus und in MC3T3-E1-Zellen wurden alle drei RAMPs nachgewiesen. Eine Behandlung mit Dexamethason führt zu einer gesteigerten RAMP 1- und RAMP 2-Expression. RAMP 3 wird dagegen nicht beeinflusst (Uzan et al., 2004).

In multinukleären Osteoklasten-ähnlichen Zellen konnten Nakamura et al. 2005 neben CTR und CRLR mRNA zunächst nur RAMP 2 mRNA nachweisen (Nakamura et al., 2005). Granholm et al. untersuchten drei Jahre später ebenfalls die Expression von RAMP 1-3 in Knochenmarksmakrophagen der Maus während der Osteoklastendifferenzierung. Ihre mRNA-Analysen zeigten jedoch, dass in M-CSF stimulierten Knochenmarkszellen alle drei RAMPs exprimiert werden (Granholm et al., 2008).

2.2.4. Receptor Component Protein

1996 wurde beim Versuch den CGRP-Rezeptor zu klonen in *Xenopus laevis* Oozyten ein zusätzliches Protein, das sogenannte CGRP Receptor Component Protein (RCP), identifiziert (Luebke et al., 1996). Bei diesem Molekül handelt es sich um ein intrazelluläres hydrophiles Protein, bestehend aus 148 Aminosäuren. Es wurde daraufhin in Maus, Kaninchen und Mensch geklont und eine 82 %-ige Homologie auf Proteinebene festgestellt (Prado et al., 2002).

Die Bedeutung des RCP ist nicht vollständig geklärt. Da in Zellen mit endogener CGRP-Rezeptoraktivität jedoch stets CRLR in Kombination mit RAMP 1 und RCP beobachtet wurde, geht man davon aus, dass es aller drei Proteine bedarf, um einen funktionsfähigen CGRP-Rezeptor zu bilden (Evans et al., 2000; Prado et al., 2002).

Es wird angenommen, dass RCP für die Signaltransduktion an insbesondere G-Protein-gekoppelten CRLR-Rezeptoren notwendig ist. So wurde mit Hilfe von Antisense-Konstrukten in NIH3T3-Zellen gezeigt, dass der Verlust von RCP mit einer Verminderung der CGRP- und Adrenomedullin-vermittelten Signaltransduktion einhergeht. Die Affinität und die CGRP-Rezeptordichte bleiben hingegen unbeeinflusst (Evans et al., 2000; Prado et al., 2002).

RCP scheint jedoch nicht generell an der Signaltransduktion beteiligt zu sein, sondern spezifisch an CRLR zu wirken oder zumindest auf bestimmte G-Protein gekoppelte Rezeptoren beschränkt zu sein (Evans et al., 2000).

2.3. Hypoxie im Knochenstoffwechsel

Im Zuge einer Fraktur kommt es zur Zerstörung von kortikalem Knochen, Periost und den umgebenden Weichteilen sowie zur Ruptur der Blutgefäße und daraus resultierender Gewebereinblutung. Die Folge ist eine reduzierte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung. Es entsteht eine lokale Gewebhypoxie. Die nachfolgende Entzündungsreaktion, die mit Einwanderung von Immunzellen in den Frakturbereich einhergeht, fördert die Regeneration (Kolar et al., 2011).

Der Sauerstoffgehalt der Atemluft beträgt ungefähr 21 %. Im arteriellen Blut liegt er in der Regel bei 12 %. Die Sauerstoffwerte im Gewebe variieren zwischen 2,5-9 % (Lewis et al., 1999). Auch im menschlichen Knochenmark sind Werte von 6,6 % gemessen worden (Harrison et al., 2002; Utting et al., 2006). Allerdings ist die Oxygenierung bei schlechter Vaskularisation und in pathologisch veränderten Geweben wahrscheinlich deutlich reduziert. So können beispielsweise Infektionen, Entzündungen, Tumoren und Diabetes mellitus oder Fraktur bedingte Ischämie zu verminderter Sauerstoffspannung im Gewebe führen (Lewis et al., 1999). Im Frakturhämatom werden bei Kaninchen im Mittel Sauerstoffwerte von 0,8 % gemessen (Utting et al., 2006).

Utting et al. beobachteten in Langzeitversuchen mit primären Rattenosteoblasten eine durch Hypoxie verursachte Reduktion der Knochenbildung. Diese ist einerseits auf eine verminderte Osteoblastenproliferation zurückzuführen, andererseits wird auch eine Hemmung der osteogenen Differenzierung vermutet. Hypoxie führt zwar nicht zu vermehrter Apoptose, bewirkt aber eine reversible Ruhigstellung der Osteoblasten (Utting et al., 2006).

Im Gegensatz dazu stimuliert eine niedrige Sauerstoffspannung die Osteoklastenbildung und die damit einhergehende Knochenresorption. Das erklärt den Verlust der Knochenmasse, der bei lokaler oder systemischer Hypoxie in Verbindung mit Frakturen, Infektionen, Tumoren oder vaskulären Erkrankungen auftreten kann (Arnett et al., 2003).

Trotz reduzierter Proliferationsrate zeigen Osteoblasten unter Sauerstoffmangel eine Hochregulation des Vascular Endothelial Growth Faktors (VEGF), einem stark angiogenetisch wirkenden Zytokin. Das deutet daraufhin, dass Osteoblasten die Neovaskularisation im Frakturbereich aktiv fördern (Steinbrech et al., 1999). VEGF ist während der Knochenheilung zusätzlich für eine adäquate Kallusbildung und Mineralisation notwendig (Street et al., 2002).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Hypoxie im Rahmen einer Fraktur die Angiogenese induziert. Die Wiederherstellung der Vaskularisation wirkt sich dann wiederum günstig auf das Knochenwachstum aus (Utting et al., 2006).

Adrenomedullin wird in zahlreichen Zellen unter Sauerstoffmangel hochreguliert. So wurde bereits 2001 gezeigt, dass die Adrenomedullin mRNA-Expression in humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC) durch Hypoxie gesteigert wird (Ogita et al., 2001). Gleiches geschieht in ischämischen Zuständen analog dazu in der murinen Lunge, Kardiomyozyten, Fibroblasten und Neuroblastomzellen (Pfeil et al., 2009). Adrenomedullin ist bekannt für seine Wirkungen auf das Gefäßsystem. Es beeinflusst den vaskulären Tonus und die Permeabilität sowie die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen. Adrenomedullin hemmt zum einen die Apoptose in Endothelzellen und fördert zum anderen die Angiogenese (Nikitenko et al., 2002).

Intermedin wird unter Hypoxie ebenfalls vermehrt exprimiert. In der Lunge scheint es die endotheliale Barrierefunktion zu verbessern und die Gefäßpermeabilität im Zuge inflammatorischer Prozesse herabzusetzen (Pfeil et al., 2009; Aslam et al., 2012).

Vor diesem Hintergrund ist vorstellbar, dass Adrenomedullin und Intermedin die Neovaskularisation im Knochenstoffwechsel ebenfalls begünstigen und dadurch Prozesse, welche unter hypoxischen Bedingungen stattfinden, wie beispielsweise Frakturheilung oder Tumorgenese, vorantreiben könnten.

3. Material und Methoden

3.1. Qualitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit MC3T3-E1 Zellen unter Normoxie-Bedingungen

3.1.1. Zellkultur

3.1.1.1. Die MC3T3-E1-Zelllinie

Kodama et al. untersuchten 1981 erstmals acht Zelllinien aus Calvariae neugeborener Mäuse. Sie wählten davon einen Klon, der eine besonders hohe Aktivität Alkalischer Phosphatase (ALP) im Ruhestadium aufweist. Diese Zelllinie, genannt MC3T3-E1, zeigt zunächst eine niedrige ALP-Aktivität im Wachstumsstadium. Charakteristischerweise vervielfacht sich die Enzymaktivität im Stadium der Konfluenz jedoch beträchtlich. Die Zellen besitzen einerseits die Fähigkeit zu Osteoblasten zu differenzieren und andererseits reichlich kollagene Interzellularsubstanzen zu sezernieren. Dabei handelt es sich um Hydroxylapatitkristalle, die in gut ausgebaute Knochensubstanz eingelagert werden (Sudo et al., 1983).

Die aktive Replikation der MC3T3-E1-Zellen findet in der initialen Entwicklungsphase statt. Diese dauert vom 1.-9. Tag nach Anlage der Kultur an und spiegelt sich in einer gesteigerten DNA-Synthese und einer zunehmenden Zellzahl wieder. Dabei behalten die Zellen ihre spindelförmige fibroblastische Morphologie bei. Ab dem 9. Tag nehmen sie mit Erreichen der Konfluenz eine kuboide Form an und stellen das Wachstum ein. Die Herunterregulation der Replikation geht mit Aktivierung der ALP, Umbau von Prokollagen zu Kollagen und Ablagerung extrazellulärer Matrix einher. Die letzte postmitotische Entwicklungsphase beginnt etwa am 16. Tag. Sie ist durch eine fortschreitende Mineralisierung gekennzeichnet. Für diesen Prozess benötigen die reifen osteoblastären MC3T3-E1-Kulturen Ascorbat und Beta-Glycerol-Phosphat. Beide Substanzen wirken synergistisch und fördern sowohl die Einlagerung von Kollagen in die extrazelluläre Matrix als auch die Induktion der ALP-Aktivität in den Zellen (Quarles et al., 1992).

3.1.1.2. Verwendete Zellen

Für die Untersuchung wurden aus der Calvaria der Maus extrahierte Zellen der Zelllinie MC3T3-E1 verwendet. Sie stammt von der DSMZ, der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland).

3.1.1.3. Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (Heraeus, Langenselbold, Deutschland) durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in einem Kohlenstoffdioxid (CO₂)-begasten Brutschrank (Heraeus) (5 % CO₂) bei einer Temperatur von 37 Grad Celsius (°C) und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert und kultiviert.

3.1.1.4. Kultivierung und Lagerung der MC3T3-E1-Zellen

Die undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen wurden in 75 Quadratcentimeter (cm²) großen, sterilen Gewebekulturflaschen (Tissue Culture Flasks, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) kultiviert. Sie erhielten ein Medium, das aus 84 % GIBCOTM MEM-Alpha Medium und Gluta MAX 32561 1x (Invitrogen, Colbe, Deutschland) sowie 15 % fötalem Kälberserum (FKS) Gold (PAA, Pasching, Austria) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) bestand. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Nach Erreichen einer Konfluenz von circa 90 % wurden die Zellen passagiert. Dies wurde wie folgt durchgeführt: Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS-Puffer; pH 7,4 10x, Invitrogen) gespült. Zum proteolytischen Ablösen der adhären Zellen wurden sie mit einem Trypsin-Gemisch, bestehend aus 5 % Trypsin Ethylendiamin-tetraacetacid (EDTA, Invitrogen) und PBS-Puffer überschichtet und 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde ein Abrunden der Zellen sichtbar. Mittels FKS Gold wurde der Ablösungsprozess gestoppt. Durch Zentrifugation (1200 revolutions per minute (rpm), 5 min, 21 °C) wurde ein Zellpellet erstellt, in 1 Milliliter (ml) Medium gelöst und auf mehrere Kulturflaschen aufgeteilt. Die Subkultivierung war einerseits notwendig, um die Zellen zu vermehren. Zum anderen wurde versucht, die Lebensbedingungen durch Reduktion der Zelldichte zu optimieren.

Zur Lagerung überschüssiger Zellen wurden diese ebenfalls mittels Trypsin vom Boden gelöst, abzentrifugiert und in FKS mit 10 % Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) langsam (1 °C pro min) im Kryoeinfriergerät EC 18 (Typ „Mr. Frosty“, Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, Deutschland) auf -80 °C gekühlt. Die Zellen konnten so bei Bedarf erneut aufgetaut und angezüchtet werden (*Abb. 8*).

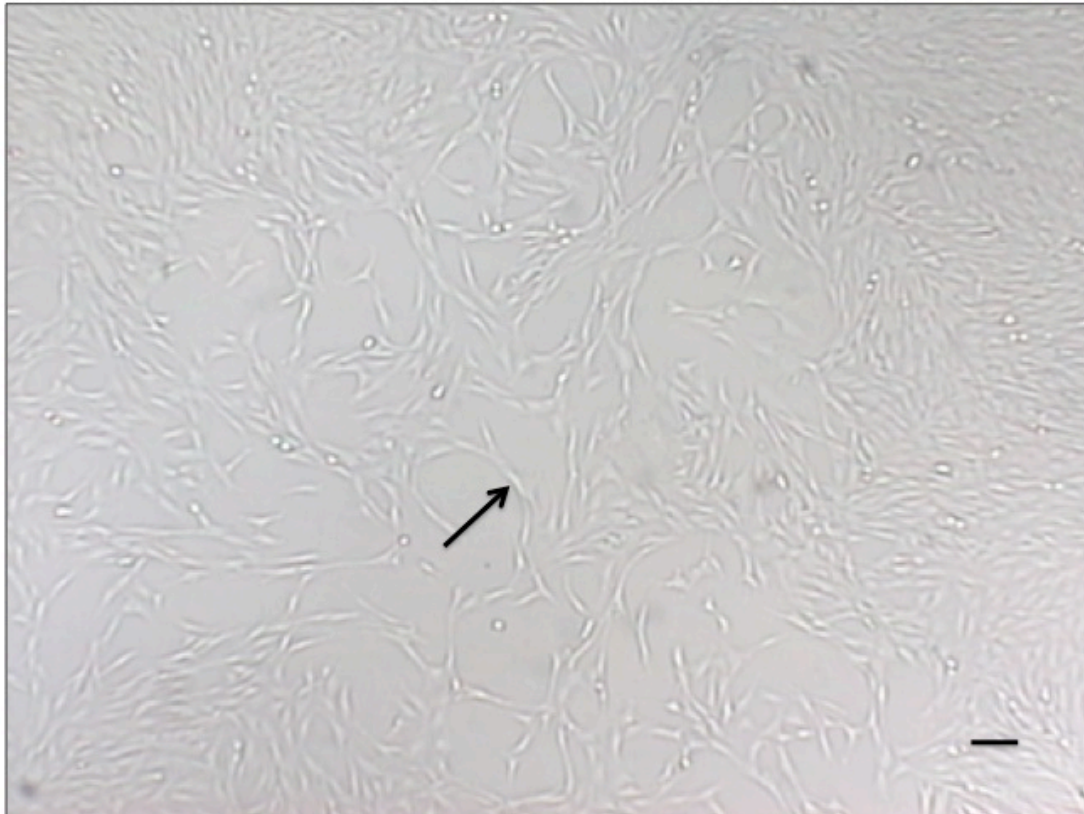


Abb. 8: Undifferenzierte MC3T3-E1-Zellen. Pfeil: Einzelne MC3T3-E1-Zelle. Maßstab: 50 Mikrometer (μm).

3.1.1.5. Osteogene Differenzierung

Für die Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen wurde ein osteogenes Medium hergestellt. Dieses bestand aus D-MEM low glucose (PAA), 10 % FKS Gold, 1 % Penicillin-Streptomycin sowie Glycerol-Phosphat (10 mM; Sigma-Aldrich), Ascorbinsäure (0.05 mM; Sigma-Aldrich) und Dexamethason (0,1 μM ; Sigma-Aldrich). Auch hier fand der Mediumwechsel alle 2-3 Tage statt (*Abb. 9*). Die RNA-Isolierung wurde jeweils 3 Wochen nach Beginn der osteogenen Differenzierung durchgeführt.



Abb. 9: Differenzierte MC3T3-E1-Zellen nach 19-tägiger Kultivierung in osteogenem Medium. Pfeil: Einzelne differenzierte MC3T3-E1-Zelle. Maßstab: 100 μ m.

3.1.2. Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden DNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet, die nicht in der Lage sind, RNA zu amplifizieren. Um die Präsenz bestimmter mRNAs nachzuweisen, wurde die RNA mit Reverse Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde im Anschluss als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet.

3.1.2.1. RNA-Extraktion

Die Isolierung der RNA aus der differenzierten und der undifferenzierten MC3T3-E1-Zelllinie fand mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers statt.

Zunächst wurden die Zellen in den Kulturfラスchen aufgeschlossen und lysiert. Um dies zu erreichen, wurden sie nach dreimaligem Spülen mit PBS-Puffer 600 Mikroliter (μl) RLT-Puffer in die Flasche gegeben. Daraufhin entstand eine geleeartige Zellsuspension.

600 μl dieses Zelllysats wurden 6 μl β-Mecaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Zur Homogenisierung wurde das Lysat anschließend auf ein QIAshredder-Säulchen (Qiagen) gegeben und zentrifugiert (18000 rpm, 2 min, 25 °C). Dem Filtrat wurden 600 μl 70 % Ethanol zugegeben. Die Probe wurde auf ein RNeasy-Säulchen gegeben und erneut zentrifugiert (10000 rpm, 15 Sekunden (s), 25 °C). So konnte die RNA mittels einer Silicagel-Membran, die sich in der Säule befindet, selektiv gebunden werden.

In den drei folgenden Waschschriffen wurde die RNA von Verunreinigen befreit:

1. Waschung mit 700 μl Puffer RW1 und Zentrifugation (10000 rpm, 15 s, 25 °C)
2. Waschung mit 500 μl Puffer RPE und Zentrifugation (10000 rpm, 15 s, 25 °C)
3. Waschung mit 500 μl Puffer RPE und Zentrifugation (10000 rpm, 2 min, 25 °C)

Der Puffer RPE musste vor Gebrauch 1:5 mit 96 % Ethanol verdünnt werden. Zum Eluieren wurden 50 μl Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auf die Säule pipettiert und anschließend zentrifugiert (10000 rpm, 1 min, 25 °C).

Die Konzentration der RNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Die gewonnene RNA wurde zur cDNA-Synthese verwendet bzw. bei -80 °C gelagert.

3.1.2.2. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden zwischen 0,126 und 0,536 Mikrogramm (μg)/μl der zuvor isolierten RNA verwendet. Zunächst wurden die entsprechenden Mengen RNA in die Cups pipettiert und mit RNase freiem Wasser (Aqua ad injectabilia) auf 8 μl aufgefüllt. Verunreinigungen durch genomische DNA wurden im Thermocycler durch Inkubation mit jeweils 1 μl DNase-I (Invitrogen) und DNase Reaction Buffer 10x (Invitrogen) für 25 min bei 37 °C abgebaut. Der DNase-Verdau wurde mittels EDTA (25 millimolar (mM), Invitrogen) für 10 min bei 65 °C gestoppt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1 μl Oligo (dT)

(Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) sowie 1 µl Desoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)-Mix (je 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP bei pH 7,0, Applied Biosystems) bei 65 °C für 5 min. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C für 3 min heruntergekühlt. Als nächstes wurden 4 µl 5x First-Strand-Buffer (Invitrogen) und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Invitrogen) jedem Ansatz hinzugefügt. Für die Umschreibung in cDNA wurde 1 µl Superscript II H-Reverse Transkriptase (Invitrogen) verwendet. Zur Kontrolle des vollständigen Abbaus der genomischen DNA wurde einem Ansatz stattdessen 1 µl RNase-freies Wasser zugesetzt und als RT-Negativkontrolle bei den RT-PCRs mitgeführt (RT-). Die Umschreibung erfolgte bei 42 °C für 52 min. Danach wurde die cDNA-Synthese durch Erhitzung auf 70 °C für 15 min gestoppt. Zum Schluss wurde das Syntheseprodukt auf 4 °C heruntergekühlt und konnte bei -20 °C gelagert werden.

Sämtliche Inkubationsschritte wurden in einem iCycler PCR-Gerät der Firma Bio-Rad durchgeführt (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

3.1.2.3. RT-PCR

Der für die PCR angesetzte Mastermix bestand aus 18,125 µl RNase freiem Wasser (Aqua ad injectabilia), 2,0 µl MgCl₂-Puffer (1 mM, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland), 2,5 µl PCR-Puffer II (Roche Applied Science), 0,625 µl dNTP-Mix (Applied Biosystems), jeweils 0,625 µl forward (fw) und reverse (rev) Primer sowie 0,125 µl AmpliTaq Gold (Roche Applied Science).

Zu 24 µl Mastermix wurde jeweils 1 µl cDNA bzw. Negativ-RT pipettiert. Zusätzlich wurde in einem Ansatz Wasser als Negativkontrolle mitgeführt. Die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs wurde durch das Erhitzen auf 95 °C über 12 min erreicht. Für die Herstellung des PCR-Produktes wurden 40 Zyklen des folgenden Programms durchlaufen: Die neu entstandenen DNA-Doppelstränge wurden über 45 s auf 95 °C erhitzt und dadurch wiederum denaturiert. Danach erfolgte die Primeranlagerung an die komplementären DNA-Abschnitte. Die Annealing-Temperatur für die verwendeten Primer lag zwischen 58 °C und 68 °C für 45 s. Die verwendete Taq DNA-Polymerase AmpliTaq Gold synthetisierte daraufhin bei 72 °C über 45 s den neuen DNA-Strang zwischen dem fw und rev Primer. Zum Schluss fand die vollständige Replikation bei 72 °C über 7 min statt. Daraufhin wurde das PCR-Produkt auf eine Temperatur von 4 °C heruntergekühlt.

Die für die PCR verwendeten Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland), aufgeführt in *Tab. 2*, waren Oligonukleotide von circa 20 Basenpaaren (bp) Länge. Sie hatten

die Eigenschaft komplementär an spezifische DNA-Abschnitte zu binden, von wo aus die Taq DNA-Polymerase die Synthese des neuen DNA-Stranges beginnen konnte.

Die Suche der Primersequenzen erfolgte über die Gendatenbank des NCBI, dem National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) unter Verwendung der BLAST-Funktion (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Als Housekeeping-Gen wurde Beta-2-Mikroglobulin (MG) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das ubiquitär in jeder Zelle vorkommt. Dadurch war es möglich, die vorangegangene RNA-Isolierung und cDNA-Synthese zu überprüfen.

Sämtliche Reaktionen wurden in einem iCycler PCR-Gerät (Bio-Rad) durchgeführt.

3.1.2.4. Gelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse wurden die Nukleinsäuren elektrophoretisch aufgetrennt, um die Größe und Reinheit der PCR-Produkte zu überprüfen.

Die Gelelektrophorese fand in einem 2 %-igem Agarosegel, bestehend aus Agarose (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) 1x, statt. TAE wurde aus 245 Gramm Tris-Base (Sigma-Aldrich), 57,1 ml Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), 100 ml 0,5 M EDTA (Invitrogen) sowie H₂O bidest hergestellt. Zu jedem PCR-Produkt wurden 3 µl DNA Gel Loading Buffer (5Prime, Hamburg, Deutschland) zugegeben, um die Auftrennung zu verfolgen. Nach Erkalten des Gels wurden zunächst 8 µl eines standardisierten 100 bp-Markers in die erste Geltasche pipettiert. Der Marker bestand aus 4 µl PerfectSize 100 bp XL Ladder-100 (5Prime), 12 µl DNA Gel Loading Buffer und 104 µl H₂O bidest. In jede weitere Geltasche wurden jeweils 10 µl des PCR-Produktes gegeben. Die elektrophoretische Auftrennung nach der Größe erfolgte in einer mit TAE 1x gefüllten Kammer bei einer Spannung von 115 Millivolt (mV) für zirka 50 min.

Für die Detektion der DNA wurde das Gel für etwa 30 min in eine Färbelösung, bestehend aus 60 ml TAE 1x und 6 µl iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, München, Deutschland), gelegt. Die DNA-Banden konnten unter UV-Licht in einem Geldokumentationsgerät (UV Solo Manual, Biometra, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht werden. Das erhaltene Bild wurde auf einer Chip-Karte im TIFF-Format gespeichert und dokumentiert. Die Produktgröße konnte schließlich durch den Höhenvergleich der einzelnen Banden mit dem Marker überprüft werden.

3.1.2.5. Verwendete Primer

Primer		Sequenz	Länge (bp)	Annealing- Temperatur	Accession
MG	fw	TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC	107	60 °C	NM_009735
	rev	GTATGTTTCGGCTTCCCATTC	(71-178)		
OPN	fw	GGATTCTGTGGACTCGGATG	245	60 °C	AF515708
	rev	GACTCACCGCTCTTCATGTG	(303-548)		
Adrenomedullin	fw	GAAGCCCACATTCTGTGTC	138	68 °C	NM_009627
	rev	TGCCGTCCTTGTCTTTGTC	(434-572)		
CRLR	fw	GCAGGACCCCATTCACA	185	62 °C	NM_018782
	rev	GGATGCCGAAACCAGTGT	(673-858)		
CGRP	fw	CCTGAAGTTCTCCCCTTTCC	244	62 °C	NM_001033954
	rev	TGCAGGATCTCTTCTGAGCA	(164-408)		
Intermedin	fw	GGTAACCCTCGGTTGCATCAG	177	68 °C	NM_182928
	rev	GGCATGACGACGAGACTTCC	(197-374)		
RAMP 1	fw	ATGGTGTGACTGGGGAAAGA	205	62-66 °C	NM_031645
	rev	CAATGAAAGGGCAGAGGATG	(205-410)		
RAMP 2	fw	TCCCTGAACCAATCTCTTCC	185	58-62 °C	NM_019444
	rev	GTCGCTGTAATGCCTGCTAA	(260-445)		
RAMP 3	fw	GCAACGAGACAGGGATGC	312	58-64 °C	BC024765
	rev	GCCACAGTCAGCACGACA	(116-428)		

Tab. 2: Verwendete Primer für die RT-PCR mit MC3T3-E1-Zellen

3.2. Qualitative RT-PCR und real-time RT-PCR mit TE 85-Zellen unter Hypoxie-Bedingungen

3.2.1. Zellkultur

3.2.1.1. Osteosarkomzelllinie TE 85 (HOS)

McAllister et al. beschrieben 1971 erstmals die humane Osteosarkomzelllinie TE 85, auch HOS TE 85 genannt (McAllister et al., 1971). Osteosarkomzellen zeichnen sich durch Bildung klonaler Zellverbände aus, welche bestimmte osteoblastäre Reifungsstadien repräsentieren. Da TE 85-Zellen sehr schnell proliferieren und eine kurze Verdopplungszeit von 21,6 Stunden besitzen, werden sie häufig zur Untersuchung osteoblastärer Eigenschaften verwendet (Clover and Gowen, 1994). Sie lassen sich relativ leicht kultivieren und stellen durch ihre zügige Vermehrung große Mengen an Zellmaterial bereit (Bilbe et al., 1996). Dennoch ist es nicht immer möglich, sie mit normalen Knochenzellen zu vergleichen, da sie zum Teil ein abnormes Wachstumsverhalten aufweisen. Zum anderen bestehen physiologische Knochenzellkulturen stets aus einer heterogenen Population, in der unterschiedliche Entwicklungsstadien vorkommen (Clover and Gowen, 1994).

Bei TE 85 handelt es sich um eine mineralisierende Zelllinie. Durch verschiedene Prozesse wie der voranschreitenden Dedifferenzierung der Osteosarkomzellen und der inadäquaten autokrinen Produktion von Wachstumsfaktoren wird die Tumorausdehnung begünstigt (Bodo et al., 2002).

3.2.1.2. Verwendete Zellen

Für die Untersuchungen wurde die humane Osteosarkomzelllinie TE 85 (HOS) verwendet, bezogen von der Zellbank MIISA, Milano (Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori). Ursprünglich stammen diese Zellen von einem 13-jährigen kaukasischen Mädchen.

3.2.1.3. Standardbedingungen, Kultivierung und Lagerung der TE 85-Zellen

Die TE 85-Zellen wurden in 25 cm² großen Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) im CO₂-begasten Brutschrank (Heraeus) (5 % CO₂) bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Das verwendete Medium bestand aus ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) und 10 % FKS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Mediumwechsel und mikroskopische Kontrolle erfolgten 3-4-mal wöchentlich. Für die Passagierung wurden die Zellen mit Hilfe von 5 % Trypsin EDTA (Invitrogen) und PBS-Puffer (Invitrogen) proteolytisch abgelöst und erneut auf mehrere Kulturflaschen verteilt. Überflüssige Zellen wurden im Kryoeinfriergerät (Hartenstein Laborbedarf) langsam auf -80 °C heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dadurch konnten sie bei Bedarf aufgetaut und erneut angezüchtet werden (*Abb. 10*).

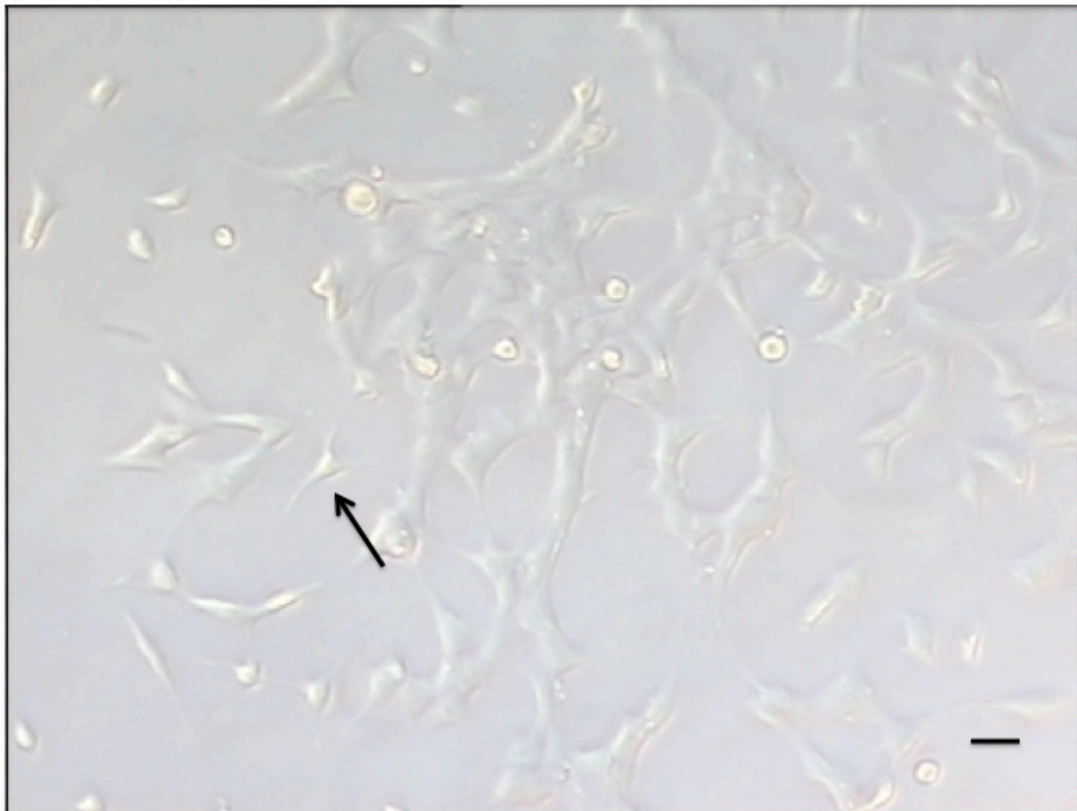


Abb. 10: Zellen der undifferenzierten TE 85-Zelllinie. Pfeil: Einzelne TE 85-Zelle. Maßstab: 25µm.

3.2.1.4. Inkubation der TE 85-Zellen unter Hypoxie-Bedingungen

Für die Hypoxie-Versuche wurden die TE 85-Zellen in insgesamt 6 Petrischalen Typ „Easy GripTM“, 35 x 10 Millimeter, FALCON, Plymouth, England) überführt. Pro Petrischale wurden 106000 Zellen ausgesät und mit 3 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium genährt (IMDM, Invitrogen). Dem Medium wurden 1,2 % Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) zugeführt. Bei zwei der sechs beimpften Petrischalen wurde, wie in *Abb. 11* dargestellt, außerdem FKS Gold (PAA) hinzugefügt. Daraufhin wurden vier Zellproben unter Normoxie-Bedingungen im CO₂-begasteten Brutschrank (Heraeus) (5 % CO₂) bei einer Temperatur von 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert, während die Zellen der übrigen beiden Ansätze Hypoxie-Bedingungen ausgesetzt wurden.

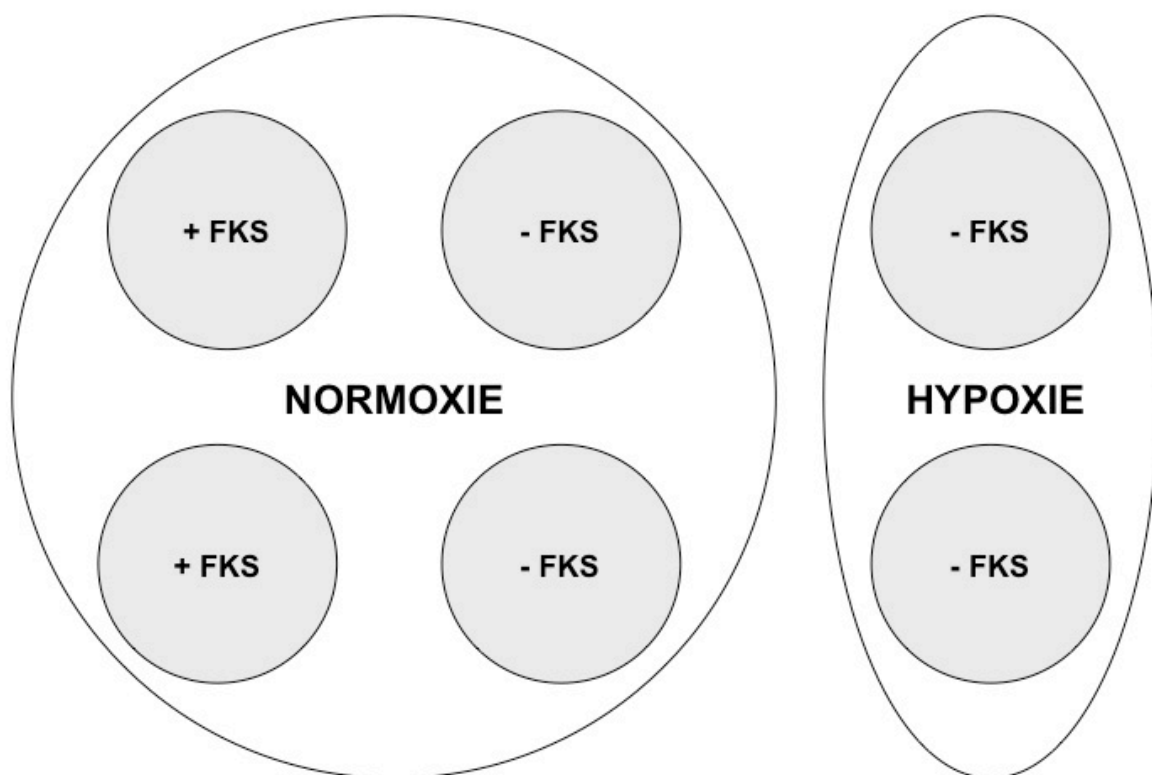


Abb. 11: Die Zellkulturen unter Normoxie-Bedingungen wurden mit (+FKS) und ohne (-FKS) fötalem Kälberserum bebrütet. Die Versuche in der Hypoxiekammer fanden ohne Zusatz von FKS statt.

Zur Schaffung eines sauerstoffarmen Milieus wurde eine Hypoxiekammer verwendet (Genbox anaer, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland). Die Genbox arbeitet mittels Generatoren, welche neben Aktivkohle auch Natriumascorbat und weitere organische und anorganische Bestandteile beinhalten, die Sauerstoff absorbieren und Kohlenstoffdioxid freigegeben. Dadurch gelingt es, nach 2,5 Stunden eine Sauerstoffkonzentration von $< 0,1 \%$ und eine Kohlenstoffdioxidkonzentration von $> 15 \%$ zu erreichen. Die Inkubation der Zellkolonien in der Hypoxiekammer fand über 8 Stunden bei 37°C statt.

3.2.2. Qualitative RT-PCR und real-time RT-PCR

3.2.2.1. RNA-Extraktion

Die Isolierung der RNA aus TE 85-Zellen fand, wie in Abschnitt 3.1.2.1. beschrieben, mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers statt.

3.2.2.2. Messung von Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA

Die Konzentrationsmessung und Überprüfung der Reinheit der gewonnenen RNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Spektrometers (Biochrom, Cambridge, England). Dazu wurden Einmal-Plastikküvetten (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) verwendet. Nach Eichung des Photometers mit $99 \mu\text{l}$ TE-Puffer (pH 7,5) wurde $1 \mu\text{l}$ der RNA-Lösung zugegeben. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 Nanometer (nm). Die RNA-Konzentration wurde durch das Gerät nach folgender Formel automatisch bestimmt:

$$\text{RNA-Konzentration} = 44 \mu\text{g/ml} \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

In der obengenannten Formel entspricht der Absorptionswert von 1 bei 260 nm (A_{260}) einer Konzentration von $44 \mu\text{g/ml}$. Diese wiederum bildet den Umrechnungsfaktor. Der Verdünnungsfaktor beträgt 100 und errechnet sich aus dem Verhältnis von $1 \mu\text{l}$ RNA-Lösung zu $99 \mu\text{l}$ TE-Puffer. Verunreinigungen von RNA-Proben mit Proteinen weisen in der Regel ein Absorptionsmaximum von 280 nm (A_{280}) auf. Darum wurden die bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionswerte ins Verhältnis gesetzt, wodurch eine Aussage über die Reinheit der gewonnen RNA getroffen werden konnte.

3.2.2.3. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese der isolierten RNA-Proben wurde mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transcription Kits (Qiagen) nach der Empfehlung des Herstellers durchgeführt.

Dafür wurde die zuvor isolierte RNA mit 2 µl gDNA Wipeout Buffer und mittels RNase-freiem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wurde für 2 min bei 42 °C inkubiert, um Kontaminationen mit genomischer DNA, die während des RNA-Isolationsprozesses nicht vollständig entfernt werden konnte, zu eliminieren. Daraufhin wurden 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl Quantiscript RT Buffer und 1 µl RT Primer Mix, bestehend aus einer Mischung aus Oligo(dT)- und Random-Primern, hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 42 °C für 30 min. Um eine Inaktivierung der Reverse Transkriptase zu erreichen, wurden die Proben schließlich für 3 min auf 95 °C erhitzt. Zur Kontrolle der vollständigen Elimination genomischer DNA wurde aus jeder einzelnen RNA-Probe zusätzlich ein entsprechender Negativ-Ansatz (RT-) hergestellt. Dabei wurde 1 µl RNase-freies Wasser anstelle der Quantiscript Reverse Transkriptase benutzt. Für alle genannten Reaktionsschritte wurde ein iCycler PCR-Gerät (Bio-Rad) verwendet.

3.2.2.4. Qualitative RT-PCR

Die qualitative RT-PCR diente vor allem der Qualitätsüberprüfung der generierten cDNA-Proben und der Etablierung der PCR-Bedingungen für die real-time RT-PCR. So wurden Adrenomedullin und Intermedin zunächst jeweils an cDNAs einer Zellpassage nach FKS-Zugabe, ohne FKS und nach Inkubation in der Hypoxiekammer qualitativ getestet. Sämtliche Reaktionen wurden in einem iCycler PCR-Gerät (Bio-Rad) durchgeführt.

3.2.2.5. Gelelektrophorese und Geldokumentation

Um die mittels qualitativer RT-PCR erzielten Produkte auswerten zu können, wurden wiederum 2 %-ige Agarose-Gele hergestellt (*siehe Abschnitt 3.1.2.4.*).

Die Beurteilung der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte unter UV-Licht in einem Geldokumentationsgerät (Biometra). Das entsprechende Bild wurde auf einer Chip-Karte im TIFF-Format gespeichert.

3.2.2.6. Etablierung der Bedingungen und Primer für die real-time RT-PCR

Alle Reaktionsschritte zur real-time RT-PCR wurden in einem iCycler PCR-Gerät mit zugehörigem MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System und einer iQTM5 Optical System Software Version 2.0 (jeweils Bio-Rad) durchgeführt.

Die optimalen Bedingungen für die real-time RT-PCR wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen gepoolter cDNA der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 etabliert. Die zu untersuchenden Zielgene waren MG, Adrenomedullin und Intermedin. Dafür wurden die cDNA-Proben zunächst mit Aqua ad injectabilia im Verhältnis 1:10 und 1:100 verdünnt. In der Folge konnte jedes der drei Zielgene unverdünnt und in den verschiedenen Verdünnungsstufen untersucht werden. Als Negativkontrollen wurden Triplikate eingesetzt, bei denen statt cDNA eine entsprechende Menge Wasser verwendet wurde.

Die Etablierung der Primer und der PCR-Bedingungen wurde mit Hilfe des QuantiFast SYBR Green Mastermix-Systems (Qiagen) durchgeführt. Sie erfolgte mit je 1 µl der jeweiligen cDNA Probe. Dieser wurden 24 µl eines Mixes zugesetzt, bestehend aus 12,5 µl QuantiFast SYBR Green Mastermix, 0,5 µl fw und rev Primer (je 20 µmolar) sowie 11 µl Aqua ad injectabilia. Durch anfängliches Erhitzen auf 95 °C für 5 min wurde der DNA-Doppelstrang denaturiert. Dem schlossen sich 40 Zyklen eines Programms an, bei welchem es im Wechsel zur Denaturierung der DNA bei 95 °C für 10 s kam sowie zur Primerbindung und Elongation bei 60 °C für weitere 30 s.

SYBR Green ist ein Farbstoff, der bei Anbindung an einen DNA-Doppelstrang zu fluoreszieren beginnt. Dadurch ist bei steigender PCR-Produktmenge auch eine Zunahme der Fluoreszenz zu verzeichnen. Diese Fluoreszenzwerte wurden am Zyklusende während des Elongationsschrittes erfasst. Im Anschluss an die PCR fand eine Schmelzkurvenanalyse statt. Als Schmelzpunkt wird diejenige Temperatur bezeichnet, bei der sich der Farbstoff wieder aus der DNA löst. Dadurch kommt es zur Fluoreszenzabnahme. Diese Schmelzkurvenanalyse verlief nach folgendem Programm: Zunächst fand eine Denaturierung der cDNA-Proben statt, indem diese für 1 min einer Temperatur von 95 °C ausgesetzt wurden. Im Anschluss wurden die Proben bei 60 °C für 1 min renaturiert. Dem folgte ein stufenweiser Temperaturanstieg (alle 10 s um jeweils 0,5 °C). Bei 95 °C endete das Programm. Die Fluoreszenzwerte wurden dabei in jedem einzelnen Temperaturschritt gemessen.

Aufgrund der ermittelten Fluoreszenzwerte konnten die PCR-Effizienz und der Korrelationskoeffizient für die Zielgene errechnet werden. Die durchgeführte Schmelzpunktanalyse

ermöglichte schließlich eine sichere Unterscheidung zwischen spezifischen Genabschnitten und unspezifischen Produkten.

MG

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung der humanen MG Primer auf quantitativer Ebene diente gepoolte cDNA aus der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85. Mittels einer Standardgerade sind die gemessenen Fluoreszenzwerte logarithmisch gegen die Zyklenzahl dargestellt. Die daraus errechnete PCR-Effizienz beträgt 102,1 %, der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,992 (*Abb. 12a*). Die Schmelzkurve erreichte in den Proben mit cDNA ihr Maximum bei 81 °C. In den Wasserkontrollen zeigte sich kein PCR-Produkt (*Abb. 12b*).

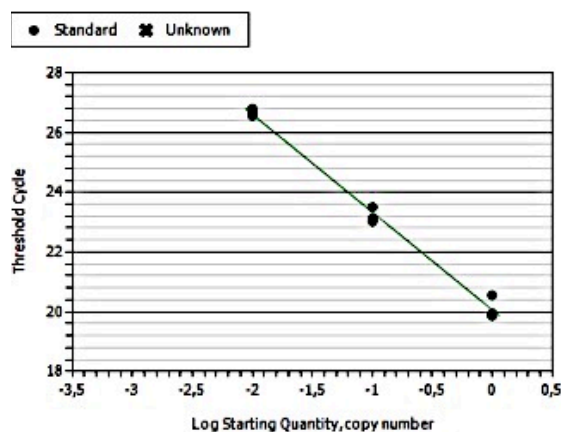


Abb. 12a: Dargestellt ist die Standardgerade von MG. Die daraus errechnete PCR-Effizienz ergibt 102,1 %. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,992. Die Steigung der Kurve beträgt -3,271.

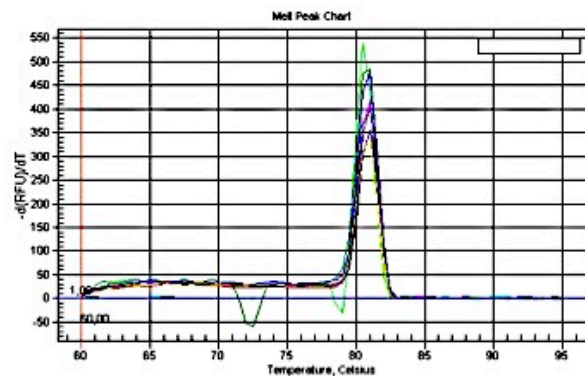


Abb. 12b: Die abgebildete Schmelzkurve von MG erreichte ihr Maximum bei 81 °C. Die Wasserkontrollen waren negativ.

Adrenomedullin

Als Ausgangsmaterial für die Etablierung der Primerbedingungen der Zielgene Adrenomedullin und Intermedin auf quantitativer Ebene wurde ebenfalls gepoolte cDNA der humanen TE 85-Zelllinie genutzt. Im Vorfeld der RT-PCR wurden Adrenomedullin und Intermedin jeweils an cDNAs einer Zellpassage nach Zugabe von FKS, ohne FKS und nach Inkubation in der Hypoxiekammer qualitativ getestet. In TE 85-Zellen (n=3) stellte sich Adrenomedullin mRNA in erwarteter Größe von 155 bp dar. Die Negativkontrolle mit Ersatz der cDNA durch Reinstwasser wies keine Bande auf.

In der real-time PCR wurde für das Zielgen Adrenomedullin anhand der Standardgerade eine PCR-Effizienz von 100,3 % berechnet. Die einzelnen Messwerte liegen mit einem Korrelationskoeffizient von 0,988 auf der Standardgeraden (*Abb. 13a*). In der Schmelzpunktanalyse stellte sich in den Proben mit cDNA jeweils ein spezifisches PCR-Produkt dar. Der Schmelzpunkt lag bei 89 °C. In der Wasserkontrolle war dieses PCR-Produkt nicht nachweisbar (*Abb. 13b*).

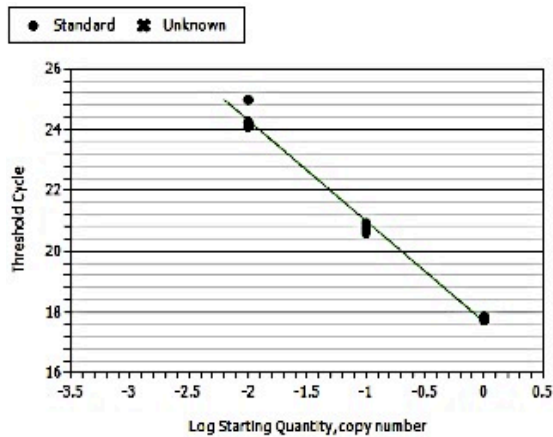


Abb. 13a: Die dargestellte Standardgerade von Adrenomedullin besitzt eine Steigung von -3,315. Die errechnete PCR-Effizienz beträgt 100,3 %. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,988.

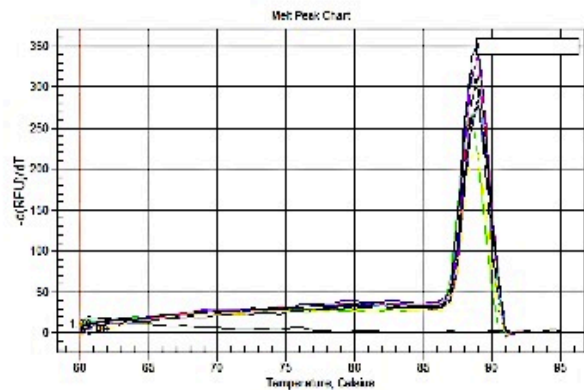


Abb. 13b: Die Schmelzkurve erreichte ihr Maximum bei 89 °C. Die Wasserkontrolle zeigte kein PCR-Produkt.

Intermedin

Vor der real-time RT-PCR wurde Intermedin mRNA in TE 85 ebenfalls qualitativ getestet (n=3) und konnte in erwarteter Größe von 156 bp nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle war sauber.

In der real-time RT-PCR errechnet sich aus der abgebildeten Standardgerade eine PCR-Effizienz von 86,3 %. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,997 (*Abb. 14a*). In den Proben, die cDNA enthielten, ergab sich für das jeweils gebildete PCR-Produkt ein Schmelzpunkt von 91 °C. In den Wasserkontrollen stellte sich dieses PCR-Produkt nicht dar (*Abb. 14b*).

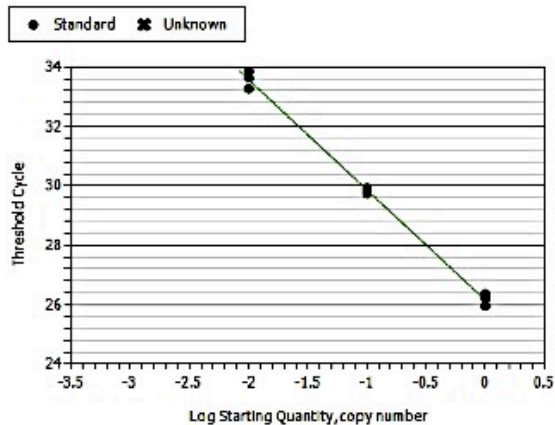


Abb. 14a: Die Abbildung zeigt die Standardgerade von Intermedin, die mit einer Steigung von -3,701 verläuft. Die aus ihr berechnete PCR-Effizienz beträgt 86,3 %. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,997.

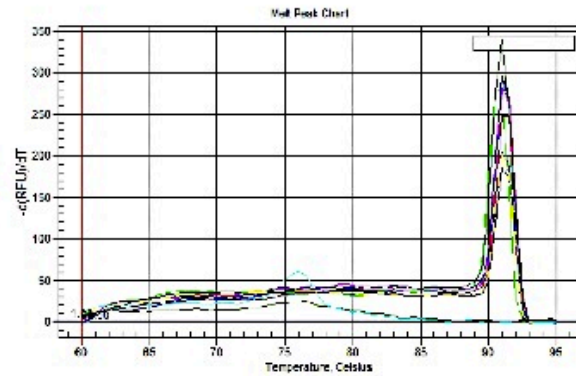


Abb. 14b: Die Schmelzkurve zeigte ein Maximum bei 91 °C. Die Wasserkontrollen waren negativ.

3.2.2.7. Durchführung der real-time RT-PCR

Im Anschluss an die Etablierung der Methode, bei der die optimalen PCR-Bedingungen geschaffen und die Primer auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft wurden, folgte die Durchführung der real-time RT-PCR. Dazu wurde jedes Zielgen mit jeder cDNA-Probe im Doppelansatz untersucht. Für jedes Zielgen kam außerdem jeweils eine Negativkontrolle zum Einsatz. Als zusätzliche Negativkontrollen wurden pro PCR-Durchlauf für jedes Zielgen zwei Wasserproben mitgeführt, in denen keine cDNA enthalten war.

Für die mRNA-Untersuchung von Adrenomedullin und Intermedin kam das QuantiFast SYBR Green Mastermix-System (Qiagen) zur Anwendung. Die Versuche wurden unter den im Vorfeld beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Es wurde 1 µl unverdünnte cDNA eingesetzt. MG wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

3.2.2.8. Verwendete Primer

Primer		Sequenz	Länge	Annealing-Temperatur	Accession
MG	fw	TCTCTCTTTCTGGCCTGGAG	134	60 °C	NM_004048
	rev	CAACTTCAATGTCGGATGGA	(98-232)		
Adrenomedullin	fw	ATGAAGGGTGCCTCTCGAAG	155	60 °C	XM_508280
	rev	GATCTGGTGTGCCAGCTTCT	(260-415)		
Intermedin	fw	GTTGCATCAGCCTCCTCTG	156	64 °C	NM_024866
	rev	AGCTTCCAGACCACAGGTC	(294-450)		

Tab. 3: Verwendete Primer für die qualitative RT-PCR und real-time RT-PCR mit TE 85-Zellen

3.2.2.9. Auswertung der Ergebnisse der real-time RT-PCR

Zur Datenauswertung wurde anfangs eine logarithmische Darstellung gewählt, bei der die bestimmten Fluoreszenzwerte gegen die Zyklenzahl aufgetragen wurden. Daraufhin wurde manuell ein sogenanntes Threshold-Level festgelegt. Das Threshold-Level bezeichnet einen Wert auf der Y-Achse, der die PCR-Verlaufskurven jeder einzelnen cDNA-Probe jeweils ungefähr in ihrem Wendepunkt schneidet. Jeder Schnittpunkt des Threshold-Levels mit den einzelnen Verlaufskurven besitzt einen entsprechenden Punkt auf der X-Achse, der cycle threshold oder Ct-Wert genannt wird. Dieser Ct-Wert wurde für jeden cDNA-Ansatz festgehalten und eine Analyse der zugehörigen Schmelzkurven durchgeführt. Außerdem fand eine Beurteilung der Negativkontrollen statt.

Im nächsten Schritt wurden die Ct-Werte der Doppelansätze gemittelt. Für die Quantifizierung der PCR, die notwendig war, um die mRNA-Expression der Zielgene Adrenomedullin und Intermedin vergleichen zu können, wurde die (delta)(delta) Ct-Methode gewählt (Pfaffl, 2001). Die einzelnen Ct-Werte wurden zunächst gegen den Ct-Wert des Housekeeping-Gens MG normalisiert. Dafür wurde der Ct-Wert von MG vom Ct-Wert von Adrenomedullin beziehungsweise Intermedin subtrahiert. Daraus ergab sich ein sogenannter deltaCt (dCt)-Wert.

Die dCt-Werte wurden im Folgenden mit der SPSS Statistik- und Analyse-Software (SPSS Inc., Chicago, USA) ausgewertet. Der Kruskal-Wallis-Test wurde als erstes angewandt (Kruskal and Wallis, 1952). Der Kruskal-Wallis-Test, auch bekannt als H-Test, ist ein

nichtparametrischer statistischer Rangsummentest zum Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben oder Gruppen hinsichtlich einer Variablen. Ergaben sich im Rahmen dieses Tests signifikante Unterschiede, so wurde im Anschluss der Mann-Whitney-Test, auch U-Test genannt, durchgeführt (Mann and Whitney, 1947). Auch der Mann-Whitney-Test für unabhängige Stichproben ist ein nichtparametrischer statistischer Rangsummentest. Er überprüft die Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen.

Die Ergebnisse für die Zielgene Adrenomedullin und Intermedin wurden anschließend als Boxplots abgebildet, um die verschiedenen Streuungs- und Lagemaße in Form einer graphischen Darstellung zusammenzufassen. Die Box entspricht hierbei dem Bereich, in den die mittleren 50 % der Daten fallen. Der Median bezeichnet den, in der Box dargestellten, durchgehenden Strich. Der Beginn der Box markiert das untere Quartil (25 %) und das Ende der Box das obere Quartil (75 %). Die sogenannten „Whiskers“ kennzeichnen den kleinsten (0 %) und den größten Wert (100 %) des Datensatzes, die keine Ausreißer sind. Ergaben sich im Mann-Whitney-Tests signifikante Unterschiede, so wurden diese bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant bezeichnet und mit einem Stern (*) markiert. Als statistisch hoch signifikant galten Unterschiede, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ aufwiesen. Diese wurden mit zwei Sternen gekennzeichnet (**).

4. Ergebnisse

4.1. Qualitative RT-PCR mit MC3T3-E1-Zellen

4.1.1. Expression der molekularen Komponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in undifferenzierten und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen

Adrenomedullin

In undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) wurde Adrenomedullin mRNA in erwarteter Größe von 138 bp nachgewiesen (*Abb. 15*). Als Positivkontrolle stellte sich im Herzgewebe (Maus) ein Produkt gleicher Größe dar (*Abb. 17*). Adrenomedullin mRNA konnte in osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) in 1 von 5 Fällen nachgewiesen werden (*Abb. 16*). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Wasser ersetzt. Hier zeigte sich keine Bande.

Intermedin

Mittels RT-PCR wurde in undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) Intermedin mRNA in 4 von 5 Fällen als einzelne saubere Bande in erwarteter Größe von 177 bp nachgewiesen (*Abb. 15*). Als Positivkontrolle wurde Niere der Maus verwendet (*Abb. 17*). In differenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) konnte Intermedin mRNA in 2 von 5 Fällen nachgewiesen werden (*Abb. 16*). Bei Ersatz der cDNA durch Reinstwasser wurde kein PCR-Produkt beobachtet.

CGRP

Der Nachweis von CGRP mRNA gelang weder in differenzierten noch in undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen (jeweils n=5) (*Abb. 16, Abb. 15*). Als Positivkontrolle wurde Hirngewebe der Maus verwendet (*Abb. 17*). Hier zeigte sich deutlich eine einzelne saubere Bande in erwarteter Größe von 244 bp. Die Negativkontrolle wies keine Bande auf.

CRLR

In undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) wurden CRLR-Fragmente in erwarteter Größe von 185 bp nachgewiesen (*Abb. 15*). Als Positivkontrolle stellte sich im Herzgewebe der

Maus ein Produkt gleicher Größe dar (*Abb. 17*). In osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) konnte CRLR mRNA ebenfalls nachgewiesen werden (*Abb. 16*). Der cDNA-Ersatz durch Wasser war negativ.

RAMP 1

In undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) konnte RAMP 1 mRNA in erwarteter Größe von 205 bp nachgewiesen werden (*Abb. 15*). Als Positivkontrolle wurde Herzgewebe (Maus) verwendet (*Abb. 17*). In differenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) stellte sich RAMP 1 mRNA ebenfalls dar (*Abb. 15*). In der Negativkontrolle wurde die cDNA jeweils durch Wasser ersetzt. Ein PCR-Produkt wurde hierbei nicht beobachtet.

RAMP 2

RAMP 2 mRNA konnte sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten MC3T3-E1-Zellen (jeweils n=5) in erwarteter Größe von 185 bp nachgewiesen werden (*Abb. 15, Abb. 16*). Als Positivkontrolle wurde Herzgewebe (Maus) verwendet (*Abb. 17*). In der Negativkontrolle wurde die cDNA durch Wasser ersetzt, wodurch sich keine Bande zeigte.

RAMP 3

In undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) wurde RAMP 3 mRNA in erwarteter Größe von 312 bp nachgewiesen (*Abb. 15*). Für die Positivkontrolle wurde Herzgewebe der Maus verwendet (*Abb. 17*). In osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) konnte RAMP 3 mRNA ebenfalls nachgewiesen werden (*Abb. 16*). In der Negativkontrolle fand der cDNA-Ersatz durch Wasser statt. Die Negativkontrolle war sauber.

Osteopontin

In undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) wurde Osteopontin (OPN) mRNA in erwarteter Größe von 245 bp nachgewiesen (*Abb. 15*). In differenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) stellte sich OPN mRNA ebenfalls als einzelne saubere Bande dar (*Abb. 16*). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Reinstwasser ersetzt. Hier lies sich keine Bande beobachten.

MG

In undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) wurde MG mRNA in erwarteter Größe von 107 bp nachgewiesen (*Abb. 15*). In differenzierten MC3T3-E1-Zellen (n=5) konnte MG mRNA ebenfalls dargestellt werden (*Abb. 16*). Als Negativkontrolle wurde die cDNA durch Wasser ersetzt. In der Negativkontrolle wurde kein PCR-Produkt gebildet.

	MC3T3-E1 undifferenziert					MC3T3-E1 osteogen differenziert				
	I	II	III	VI	V	I	II	III	VI	V
Adrenomedullin	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Intermedin	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
CGRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRLR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RAMP 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RAMP 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RAMP 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 4: In der Tabelle sind die Ergebnisse der qualitativen RT-PCR in undifferenzierten und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen zusammengefasst.

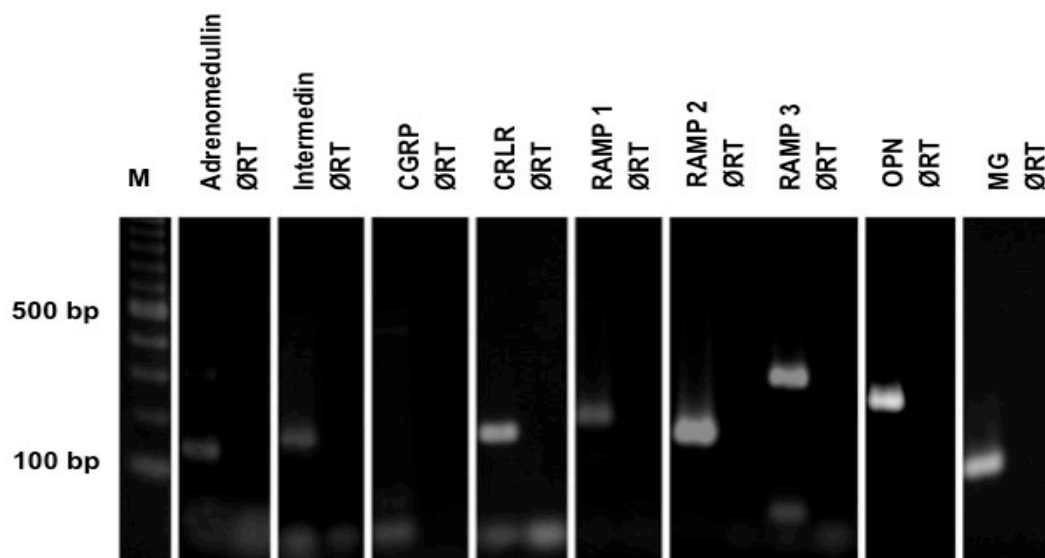


Abb. 15: MC3T3-E1 undifferenziert. Dargestellt ist die Expression der einzelnen Komponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen. Während sich bei Adrenomedullin, Intermedin, CRLR, Ramp 1, Ramp 2, Ramp 3 sowie OPN und dem Housekeeping-Gen MG saubere Banden in entsprechender Größe zeigten, gelang der Nachweis von CGRP nicht. Unterhalb des 100 bp-Markers kommen Primerdimere zur Darstellung. Bei diesem Phänomen handelt es sich um nicht umgesetzte Primer, weshalb es sich auch in der Ø RT beobachten lässt.

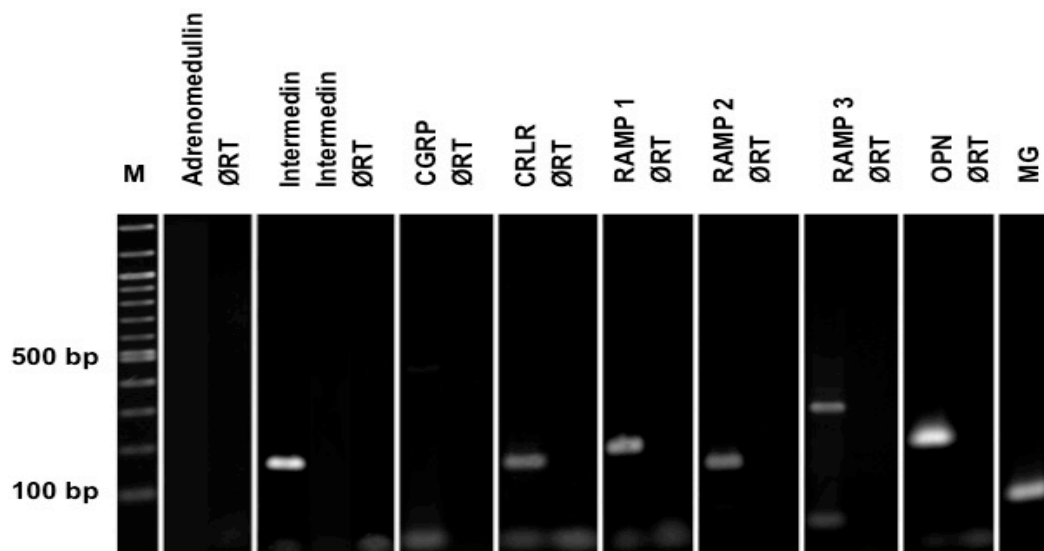


Abb. 16: MC3T3-E1 osteogen. Dargestellt ist der Nachweis einzelner Proteine der Calcitonin-Peptid-Familie in MC3T3-E1-Zellen nach osteogener Differenzierung. Es handelt sich um repräsentative Ergebnisse aus jeweils 5 Versuchen. Bei CRLR, Ramp 1, Ramp 2, Ramp 3 sowie bei OPN und dem Housekeeping-Gen MG zeigten sich einzelne saubere Banden in entsprechender Größe. Der Nachweis von Adrenomedullin gelang in differenzierten Zellen in 1 von 5 Fällen. Intermedin konnte in 2 von 5 Fällen beobachtet werden. CGRP konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Unterhalb des 100 bp-Markers treten Primerdimere auf. Die Ø RT stellt die Negativkontrolle dar.

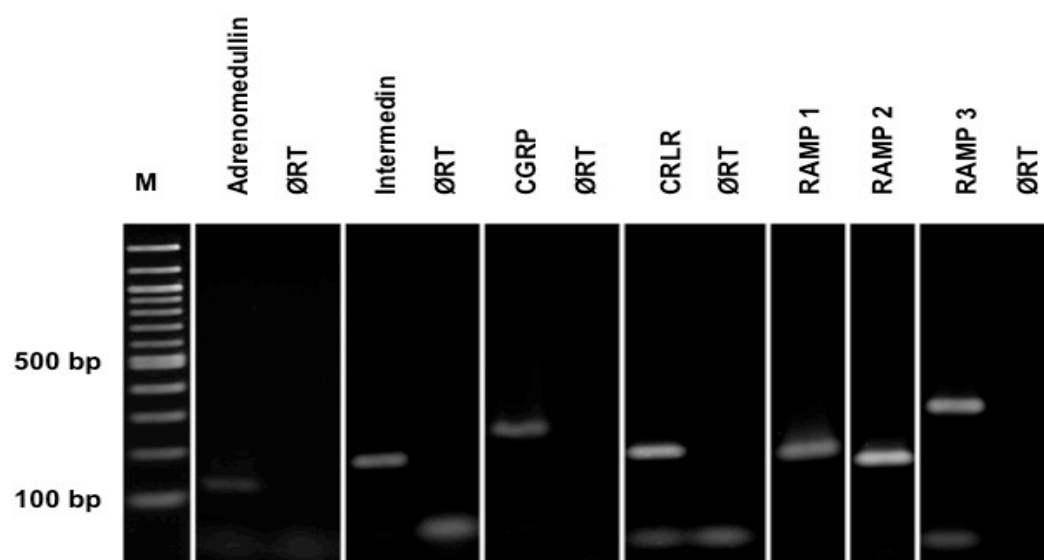


Abb. 17: Positivkontrollen. Die Abbildung zeigt die mRNA-Expression der Calcitonin-Peptid-Familie in verschiedenen Gewebetypen der Maus. Unter denselben PCR-Bedingungen wie in undifferenzierten und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen stellten sich jeweils Produkte gleicher Größe dar. So konnten Adrenomedullin, CRLR, Ramp 1, Ramp 2 und Ramp 3 im Herz, Intermedin in der Niere und CGRP im Hirngewebe nachgewiesen werden. Unterhalb des 100 bp-Marker kam es ebenfalls zur Darstellung von Primerdimeren. Die Ø RT bezeichnet die Negativkontrolle.

4.2. Real-time RT-PCR mit TE 85-Zellen

4.2.1. Ergebnisse der real-time RT-PCR

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression der einzelnen Zielgene wurden die gemittelten CT-Werte jeder Probe gegen den entsprechenden CT-Wert des Housekeeping-Gens MG normiert. Die erhaltenen dCT-Werte sind in den nachfolgenden Tabellen (*Tab. 5 und Tab. 6*) aufgeführt.

TE 85 Zellpassage	CT Adrenomedullin – CT MG		
	Normoxie (+FKS)	Normoxie (-FKS)	Hypoxie (-FKS)
p178	2,88	2,70	1,34
p180	2,41	2,80	1,24
p181	3,19	2,72	1,04
p183	3,13	3,05	1,04

Tab. 5: Berechnete dCT-Werte für Adrenomedullin

TE 85 Zellpassage	CT Intermedin – CT MG		
	Normoxie (+FKS)	Normoxie (-FKS)	Hypoxie (-FKS)
p178	11,74	8,68	10,02
p180	9,61	9,66	10,46
p181	10,96	8,89	10,55
p183	11,47	9,59	9,68

Tab. 6: Berechnete dCT-Werte für Intermedin

Die aufgeführten dCT-Werte der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 wurden nach Behandlung mit FKS, ohne FKS und nachdem die Zellen 8-stündiger Hypoxie ausgesetzt waren, statistisch untereinander verglichen. Die Ergebnisse sind im Folgenden in Form von Boxplots graphisch dargestellt.

Adrenomedullin

Beim Vergleich der dCT-Werte der Adrenomedullin mRNA-Expression nach Inkubation der TE 85-Zellen mit beziehungsweise ohne FKS (jeweils $n=4$) ergaben sich im Mann-Whitney-Test keine signifikanten Unterschiede ($p=0,486$).

Bei der Gegenüberstellung der dCT-Werte unter Normoxie mit denen unter hypoxischen Bedingungen ($n=4$) fielen jedoch durchaus statistisch signifikante Unterschiede auf (jeweils $p=0,029$). Die dCT-Werte waren unter Hypoxie geringer als die jeweiligen dCT-Werte unter Normoxie. Demzufolge wurde das Threshold-Level in den Hypoxie-Versuchen bereits nach wenigen PCR-Zyklen erreicht. Es war also relativ mehr Adrenomedullin mRNA vorhanden. Das bedeutet, dass die Expression von Adrenomedullin unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie-Bedingungen signifikant hochreguliert wurde. Die Zugabe von FKS schien die Adrenomedullin mRNA-Expression hingegen nicht zu beeinflussen (*Abb. 18*).

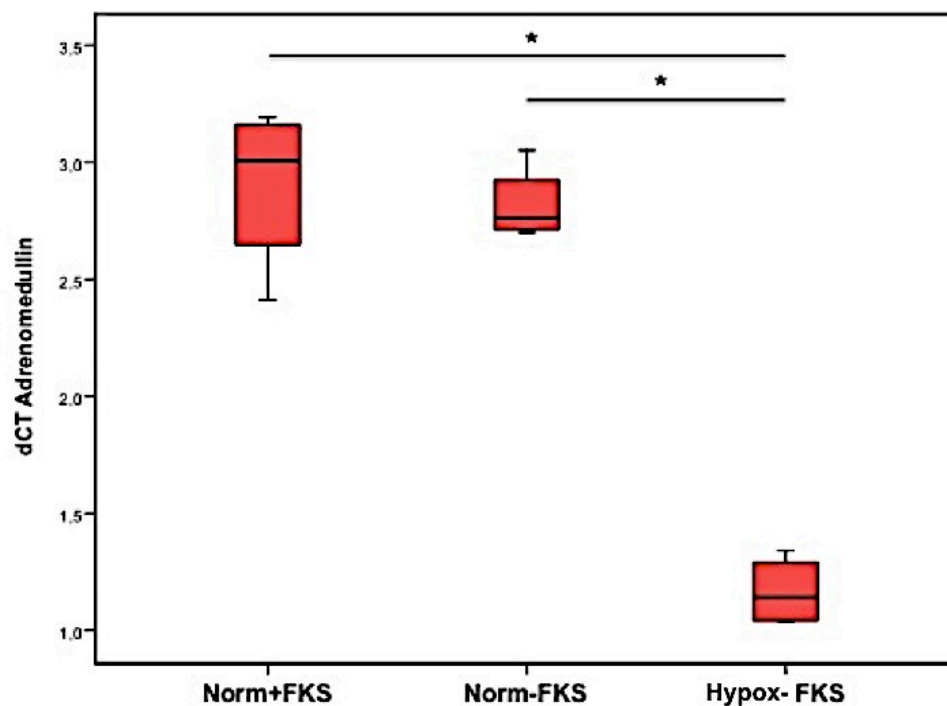


Abb. 18: Boxplot des statistischen Vergleichs von dCT-Werten der Adrenomedullin mRNA-Expression in TE 85-Zellen. Die Abbildung stellt Ergebnisse aus 4 Versuchen dar. Adrenomedullin wurde unter Hypoxie (Hypox-FKS) signifikant hochreguliert. Zugabe oder Verzicht auf FKS im Medium (Norm+FKS bzw. Norm-FKS) beeinflussten die Adrenomedullin mRNA-Expression nicht.

Intermedin

Bei Gegenüberstellung der dCT-Werte von Intermedin nach Inkubation der Osteosarkomzellen in Normoxie ergaben sich mit und ohne FKS (jeweils n=4) keine statistisch signifikanten Unterschiede im Mann-Whitney-Test ($p=0,057$). Auch beim Vergleich der dCT-Werte aus den Normoxieversuchen unter FKS mit denen in Hypoxie (n=4) konnte hinsichtlich der Expression von Intermedin keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ($p=0,343$). Ohne FKS ist der Unterschied jedoch signifikant ($p=0,029$). Dieses Ergebnis spricht für Herunterregulation von Intermedin mRNA in Hypoxie bei Verzicht auf FKS (Abb. 19).

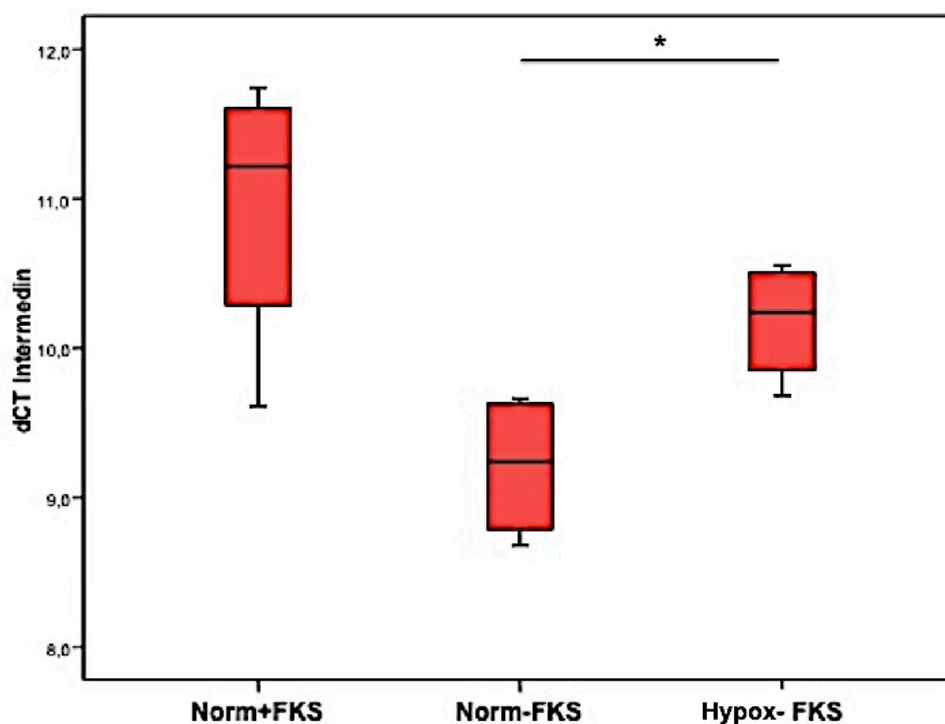


Abb. 19: Boxplot des statistischen Vergleichs von dCT-Werten der Intermedin mRNA-Expression in TE 85-Zellen. In der Abbildung sind Ergebnisse aus 4 Versuchen dargestellt. Bei Verzicht auf FKS (Norm-FKS) wurde die Intermedin mRNA-Expression unter hypoxischen Bedingungen (Hypox-FKS) signifikant herunterreguliert. Wurde dem Medium FKS (Norm+FKS) beigelegt, war hingegen keine Regulation zu beobachten.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der mRNA-Expression einzelner Komponenten der Calcitonin-Familie in undifferenzierten und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf jene Peptide gelegt, die hauptsächlich über den CRLR in Kombination mit den verschiedenen RAMPs wirken: Adrenomedullin, Intermedin und CGRP. Die beschriebenen Versuche wurden mittels qualitativer RT-PCR durchgeführt. Der Nachweis von Intermedin in Osteoblasten ist in der Literatur bisher noch nicht dokumentiert. Die murine MC3T3-E1-Zelllinie wurde außerdem erstmalig nach osteogener Differenzierung auf das Vorkommen von Adrenomedullin, CGRP, CRLR und RAMP 1-3 untersucht. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit erstmals die Regulation von Adrenomedullin und Intermedin unter Hypoxie in der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 mit Hilfe der real-time RT-PCR beschrieben.

5.1. Expression der molekularen Komponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in undifferenzierten und differenzierten MC3T3-E1-Zellen

Die murine MC3T3-E1-Zelllinie wurde vor und nach osteogener Differenzierung auf die mRNA-Expression einzelner Peptide der Calcitonin-Familie und der entsprechenden Rezeptorkomponenten untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass CRLR und RAMP 1-3 sowohl in undifferenzierten als auch in osteogen differenzierten Zellen vorkommen. Der sichere Nachweis von Adrenomedullin gelingt nur in undifferenzierten Zellen, während Intermedin zumindest gelegentlich auch in osteogen differenzierten Zellen beobachtet werden kann. CGRP wird in MC3T3-E1-Zellen nicht exprimiert.

5.1.1. Adrenomedullin

Das Vorkommen von Adrenomedullin wurde mittels RT-PCR in undifferenzierten und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen untersucht. Während die Adrenomedullin mRNA-Expression in undifferenzierten Zellen eindeutig belegt werden konnte, gelang der Nachweis in den differenzierten Zellen nur in einem von fünf Fällen.

Uzan et al. zeigten 2004, dass undifferenzierte MC3T3-E1-Zellen sowie reife osteoblastäre Zellen aus der Calvaria der Maus Adrenomedullin mRNA exprimieren. Sie beobachteten weiterhin, dass die mRNA-Expression nach Dexamethasongabe deutlich ansteigt. Das Maximum der mRNA-Expression wird nach 6-stündiger Inkubation bei einer Konzentration von 10^{-7} molar (M) erreicht. Werden die MC3T3-E1-Zellen Dexamethason jedoch 8 und 10 Stunden ausgesetzt, so ist wieder eine stufenweise Abnahme der Expression zu beobachten, wenngleich noch immer erhöhte Werten im Vergleich zur Kontrollgruppe vorliegen. Nach 24 Stunden ist die Adrenomedullin mRNA-Expression in osteoblastären Zellen nicht mehr signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Uzan et al., 2004).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde Dexamethason verwendet. Die MC3T3-E1-Zellen wurden über einen Zeitraum von drei Wochen mit Dexamethason-haltigem Medium behandelt, um eine osteogene Differenzierung zu erreichen. Adrenomedullin wird in dieser Zeit herunterreguliert. Diese Ergebnisse könnten dafür sprechen, dass MC3T3-E1-Zellen bei chronischer Glukokortikoidexposition vermindert Adrenomedullin mRNA exprimieren.

Adrenomedullin wirkt anabol auf den Knochenstoffwechsel. Es stimuliert die Osteoblastenproliferation und die Knochenbildung. Bei Mäusen führt eine subkutane lokale Adrenomedullin-Injektion zu einer vermehrten Osteoidbildung und Knochenmineralisation (Cornish et al., 1997).

Naot et al. wiesen nach, dass sowohl Adrenomedullin als auch Adrenomedullin mRNA in primären osteoblastären Zellen stark exprimiert werden. Weiterhin bewiesen sie, dass Adrenomedullin selbst spezifisch an Rattenosteoblasten anbindet. Eine gleichzeitige Expression von Adrenomedullin und seinen Rezeptoren lässt darauf schließen, dass das Peptid an der parakrinen beziehungsweise autokrinen Regulation des Knochenstoffwechsels teilnimmt (Naot et al., 2001).

Im Gegensatz zu den restlichen Peptiden der Calcitonin-Familie hemmt Adrenomedullin jedoch weder die Bildung noch die Funktion der Osteoklasten und damit auch nicht die Knochenresorption. Die Ursache dafür ist weiterhin unklar. Aufgrund der Tatsache, dass Granholm et al. 2011 eine verminderte cAMP-Konzentration in RANKL stimulierten

Knochenmarksmakrophagen beobachteten, stellten sie die Vermutung auf, dass RANKL während der Osteoklastendifferenzierung zu einer Minderung der cAMP-abhängigen Signaltransduktion am Adrenomedullinrezeptor führt. Auch die Möglichkeit, dass ein weiterer, bisher unbekannter Adrenomedullinrezeptor existiert, wurde von Granholm et al. in Erwägung gezogen (Granholm et al., 2011).

5.1.2. Intermedin

Intermedin als jüngster Vertreter der Calcitonin-Familie wurde mittels RT-PCR erstmals in der murinen Zelllinie MC3T3-E1 nachgewiesen. So konnte das Vorkommen von Intermedin mRNA in undifferenzierten Zellen sicher belegt werden, während der Nachweis in osteogen differenzierten Zellen nur in zwei von fünf Fällen gelang.

Bisher wurde Intermedin mRNA weder in Osteoblasten noch in Osteoklasten detektiert. Granholm et al. wiesen 2011 eine akute Intermedin vermittelte Hemmung der Knochenresorption an Calvariaknochen der Maus nach. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Erkenntnissen über die restlichen Peptide der Calcitonin-Familie mit Ausnahme Adrenomedullins. Auch Intermedin führt zu einer vorübergehenden Aktivitätshemmung reifer Osteoklasten. Es zeigte sich weiterhin, dass Intermedin zusätzlich die Osteoklastenentwicklung in einem Spätstadium beeinflusst, indem es wahrscheinlich die Fusion von mononukleären Vorläuferzellen zu reifen multinukleären Osteoklasten blockiert (Granholm et al., 2011).

Zu klären bleibt die Frage, warum Intermedin nach osteogener Differenzierung nur noch teilweise gefunden wurde. Im Rahmen der qualitativen RT-PCR kann zwar der Nachweis von Intermedin mRNA erfolgen, jedoch keine Aussage über die vorhandene Menge getroffen werden. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Intermedin mRNA, könnte in einer Herunterregulation der mRNA-Expression während der osteogenen Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen gesehen werden. Vorstellbar wäre, dass sich die mRNA-Menge dabei in einem Schwellenbereich befindet, indem sie zum Teil gerade noch durch die Methode der RT-PCR erfasst werden kann, während die Detektion in anderen Proben nicht gelingt.

Offen bleibt außerdem, inwieweit Intermedin das Knochenwachstum beeinflusst und ob es neben seinen knochenresorptiven Effekten ähnlich wie Amylin, Adrenomedullin oder CGRP auch proliferativ auf Osteoblasten wirken kann.

5.1.3. CGRP

Neben Adrenomedullin und Intermedin wurden MC3T3-E1-Zellen auch auf das Vorkommen von CGRP untersucht. Dabei konnte CGRP jedoch weder in undifferenzierten noch in osteogen differenzierten Zellen nachgewiesen werden.

Bekannt ist, dass CGRP im gesamten zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreitet ist. Das Vorkommen CGRP-haltiger neuronaler Fasern in unmittelbarer Nähe von Knochenzellen sowie die Expression von CGRP-Rezeptoren auf Osteoblasten und Knochenmarksmakrophagen während der Osteoklastendifferenzierung indizieren, dass CGRP einen lokalen Regulator des Knochenstoffwechsels darstellt (Irie et al., 2002; Granholm et al., 2008; Lerner and Persson, 2008)

Da jedoch keine CGRP mRNA in MC3T3-E1-Zellen detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass es sich hier um einen ausschließlich parakrinen Mechanismus handelt und im Gegensatz zu Adrenomedullin keine zusätzliche autokrine Stimulation stattfindet.

CGRP steigert die Osteoblastenproliferation (Cornish et al., 1999). Die selektive Ausschaltung des α CGRP-Gens führt bei Mäusen zu einer Verringerung der Knochenbildungsrate und damit zu verminderter Knochenmasse. Diese Erkenntnis führt zu der Vermutung, dass α CGRP einen wichtigen Aktivator der Knochenbildung darstellt (Schinke et al., 2004). Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass α CGRP-defiziente Mäuse dennoch β CGRP exprimieren. Die physiologische Bedeutung zwischen der α CGRP- und β CGRP-Expression ist bisher noch ungeklärt. Auch die Frage, welchen Phänotyp β CGRP-defiziente beziehungsweise α - und β CGRP-defiziente Mäuse entwickeln, erfordert weitere Untersuchungen (Lerner and Persson, 2008).

Außerdem wird das Einsprießen von CGRP-haltigen Nervenfasern während der Frakturheilung beobachtet und auch hier eine aktive Teilnahme am Knochenaufbau vermutet (Li et al., 2007; Lerner and Persson, 2008).

5.1.4. CRLR

Die MC3T3-E1-Zelllinie wurde neben den drei aufgeführten Peptiden der Calcitonin-Familie auch auf die mRNA-Expression des G-Protein-gekoppelten Rezeptors CRLR untersucht. Da Adrenomedullin, Intermedin und CGRP Affinität zu diesem Rezeptor aufweisen, lag die Vermutung nahe, dass er ebenfalls exprimiert wird. Der Nachweis von CRLR gelang in undifferenzierten sowie in osteogen differenzierten Zellen.

Es ist bekannt, dass CRLR neben vielen anderen Organen sowohl in Osteoklasten als auch in Osteoblasten-ähnlichen Zellen vorkommt, welche der Calvaria fetaler Ratten und der Zelllinie UMR106-06 entstammen (Naot et al., 2001; Nakamura et al., 2005).

Bereits 2004 wurde dieser Rezeptor auch in undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen detektiert (Uzan et al., 2004). Im Gegensatz dazu sind osteogen differenzierte MC3T3-E1-Zellen erstmalig auf eine CRLR-Expression untersucht worden.

Uzan et al. wiesen nach, dass CRLR mRNA nach 6-stündiger Inkubation in 10^{-7} M Dexamethason leicht vermindert exprimiert wird. In murinen osteoblastären Calvariazellen der Maus wurde hingegen eine signifikante Herunterregulation der CRLR mRNA nach 6- und 24-stündiger Dexamethasonbehandlung beobachtet. Zusätzlich wurde mittels Western blot Analysen eine entsprechende Abnahme der CRLR-Protein-Expression durch Dexamethason aufgezeigt. Uzan et al. vermuteten, dass die Herunterregulation des CRLR durch Glukokortikoide somit zu einer verminderten Expression des Adrenomedullinrezeptors führt. Dadurch wird wahrscheinlich auch das Osteoblasten stimulierende Adrenomedullin in seiner Wirkung eingeschränkt. Diese Theorie könnte wiederum mit der Tatsache in Einklang gebracht werden, dass eine Glukokortikoidexposition eine Osteopenie infolge verminderter Knochenbildung verursachen kann (Uzan et al., 2004).

Nikitenko et al. untersuchten 2003 die Gen-Promotor-Region des humanen CRLR. Dabei beobachteten sie neben mehreren Glukokortikoid-Rezeptorbindungsstellen unter anderem auch Hypoxie-responsive Elemente. Sie zeigten zusätzlich, dass CRLR unter hypoxischen Bedingungen in humanen mikrovaskulären Endothelzellen zusammen mit Adrenomedullin vermehrt exprimiert wird. Nikitenko et al. schlussfolgerten, dass diese gemeinsame Regulation wichtig für vaskuläre Reaktionen unter Hypoxie sein könnte (Nikitenko et al., 2003).

Diese Erkenntnisse werfen die Frage auf, ob eine niedrige Sauerstoffspannung im Knochen ebenfalls Einfluss auf Regulation von CRLR hat und ob auch hier ischämische Bedingungen die Induktion des Rezeptors bewirken.

5.1.5. RAMP

Die MC3T3-E1-Zellen wurden außerdem auf das Vorkommen von RAMP 1-3 untersucht. Der CRLR kann nicht als eigenständiger Rezeptor agieren und ist deshalb auf die RAMPs angewiesen, um eine Affinität gegenüber Adrenomedullin, Intermedin und CGRP auszubilden. RAMP 1, RAMP 2 und RAMP 3 konnten alle sicher in undifferenzierten und in osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen nachgewiesen werden.

Die RAMPs wurden 2001 erstmals in Osteoblasten gefunden. Damals detektierten sie Naot et al. in osteoblastären Calvariazellen der Ratte und der Osteosarkomzelllinie UMR106-06 (Naot et al., 2001). Granholm et al. wiesen später alle drei RAMPs in Knochenmarksmakrophagen während der Osteoklastendifferenzierung in Mäusen nach (Granholm et al., 2008).

In undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen wurden RAMP 1-3 ebenfalls beobachtet. Der Nachweis gelang Uzan et al. im Jahr 2004 (Uzan et al., 2004). Die Expression in den osteogen differenzierten Zellen wurde jedoch bisher noch nicht untersucht.

Zusätzlich eruierten Uzan et al. wiederum die Auswirkungen einer Dexamethasoninkubation auf die mRNA- und die Protein-Expression mittels semiquantitativer real-time PCR beziehungsweise Western blot Analysen. Sie zeigten einen signifikanten zeitabhängigen Anstieg der RAMP 1 und RAMP 2 mRNA in MC3T3-E1-Zellen mit einem Maximum nach 6- bis 10-stündiger Dexamethasonbehandlung bei einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-9} M. RAMP 3 bleibt hingegen unbeeinflusst. Auch die Protein-Expression von RAMP 1 und RAMP 2 wird durch Dexamethason hochreguliert (Uzan et al., 2004).

In Verbindung mit RAMP 1 dient der CRLR als Rezeptor für CGRP, während er zusammen mit RAMP 2 und RAMP 3 als Adrenomedullin-Rezeptor fungiert (Granholm et al., 2011). CRLR kann jedoch auch einen Intermedin-Rezeptor bilden. Dies geschieht nichtselektiv, das heißt entweder mit RAMP 1, RAMP 2 oder RAMP 3 (Roh et al., 2004). Auffällig ist, dass sich die CRLR und RAMP-Expression in der Untersuchung von Uzan et al. gegensätzlich verhalten. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass RAMPs nicht nur mit CRLR dimerisieren, sondern auch mit vielen anderen Rezeptoren zusammenspielen und deshalb unterschiedlich reguliert werden (Uzan et al., 2004).

Uzan et al. beobachteten den Einfluss von Glukokortikoiden auf die RAMPs in MC3T3-E1-Zellen über einen kurzen Zeitraum von mehreren Stunden. Dadurch kann jedoch noch keine Aussage über die Auswirkungen einer Langzeitbehandlung getroffen werden. Auch hier

könnte die chronische Exposition mit Glukokortikoiden Ansatzpunkte für weitere Forschungen darstellen.

2003 demonstrierten Nikitenko et al., dass sowohl CRLR als auch Adrenomedullin in mikrovaskulären Endothelzellen unter Hypoxie vermehrt exprimiert werden. Eine Hoch- oder Herunterregulation der drei RAMPs unter Sauerstoffmangel konnten sie aber nicht feststellen (Nikitenko et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurde bisher jedoch noch nicht untersucht, wie sich eine verminderte Sauerstoffspannung auf die Regulation der RAMPs in Knochenzellen auswirkt.

5.2. Regulation von Adrenomedullin und Intermedin unter Hypoxie

In der Lunge wurde gezeigt, dass Adrenomedullin und Intermedin durch Hypoxie induziert werden (Pfeil et al., 2009). Vor diesem Hintergrund soll in der vorliegenden Arbeit erstmals erörtert werden, ob Sauerstoffmangel auch in der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 zur Regulation dieser beiden Peptide führt.

Es zeigte sich, dass Adrenomedullin unter Hypoxie ebenfalls signifikant hochreguliert wird. Im Gegensatz dazu ist bei Intermedin unter gleichen Bedingungen eine Herunterregulation zu beobachten.

5.2.1 Adrenomedullin

Die humane Osteosarkomzelllinie TE 85 wurde mittels real-time RT-PCR auf die Induktion von Adrenomedullin mRNA unter extremer Hypoxie von 0,1 % Sauerstoff untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Hochregulation im Vergleich zu normoxischen Bedingungen.

Ogita et al. fanden als erste Arbeitsgruppe heraus, dass Adrenomedullin mRNA unter Hypoxie in HUVEC-Zellen hochreguliert wird (Ogita et al., 2001). Als Grundlage dieser Untersuchung dienten Beobachtungen, die belegen, dass unter anderem Patienten mit Herzinsuffizienz, akutem Myokardinfarkt oder hypoxämischen Lungenerkrankungen erhöhte Adrenomedullin-Plasmaspiegel aufweisen (Jougasaki et al., 1995; Kobayashi et al., 1996; Kohno et al., 1996).

Auch Nikitenko et al. zeigten 2003, dass Adrenomedullin in humanen mikrovaskulären Endothelzellen unter sehr starker Hypoxie von 0,1 % Sauerstoff zusammen mit seinem G-Protein gekoppelten Rezeptor CRLR stärker exprimiert wird. Sie vermuteten, dass Adrenomedullin durch diesen Mechanismus seine Wirkungen auf das Gefäßsystem in kritischen Situationen besser ausüben kann (Nikitenko et al., 2003).

In der murinen Lunge wird Adrenomedullin mRNA unter Sauerstoffmangel ebenfalls hochreguliert. Gleiches geschieht in Herzmuskelzellen, Fibroblasten und Neuroblastomzellen (Pfeil et al., 2009).

Die Induktion von Adrenomedullin bei verminderter Sauerstoffkonzentration scheint über den Hypoxie-induzierten Faktor-1 (HIF-1) reguliert zu werden. Im menschlichen Adrenomedullin-Gen wurden Hypoxie-responsible Elemente gefunden. So gingen Garayoa et

al. davon aus, dass das Peptid auch in der Karzinomentstehung eine wichtige Rolle spielt, da viele Tumoren hypoxische Bereiche aufweisen (Garayoa et al., 2000).

In der Osteosarkomzelllinie TE 85 wird Adrenomedullin unter hypoxischen Bedingungen ebenfalls hochreguliert. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den bisher vorliegenden Erkenntnissen in Einklang bringen. Adrenomedullin wirkt vasodilatativ und fördert gleichzeitig Gefäßproliferation und Angiogenese (Kitamura et al., 1993a; Nikitenko et al., 2002). Dadurch besitzt es ideale Eigenschaften, um Wachstum und Nährstoffversorgung von Tumorzellen, wie denen des Osteosarkoms, in sauerstoffarmen Arealen zu verbessern. Zusätzlich hemmt das Peptid durch autokrine beziehungsweise parakrine Mechanismen die Induktion der Apoptose (Kato et al., 1997) und begünstigt wahrscheinlich auch dadurch das unkontrollierte Wachstum und die Entartungstendenz dieser Zelllinie.

Auch nach Knochenverletzungen fördert Hypoxie die Angiogenese. Es ist gut vorstellbar, dass eine HIF-1-vermittelte Hochregulation von Adrenomedullin die Knochendefektheilung ebenfalls begünstigt, indem sie die Neovaskularisation im Frakturgebiet vorantreibt.

5.2.2. Intermedin

Auch die mRNA-Expression von Intermedin wurde in humanen TE 85-Zellen unter Hypoxie untersucht. Im Gegensatz zu Adrenomedullin wird Intermedin bei Sauerstoffmangel jedoch herunterreguliert. Eine statistisch signifikante Regulation konnte nur bei Verzicht auf FKS beobachtet werden.

FKS versorgt die Zellen im Kulturmedium mit einer Vielzahl zusätzlicher Nährstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren. Im Rahmen einer Minderperfusion der Gefäße kommt es neben lokaler Hypoxie auch zu einer reduzierten Nährstoffzufuhr. Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Verminderung der Intermedin mRNA könnte in einer immernoch ausreichenden Versorgung der Zellen mit notwendigen Substraten bei FKS-Zusatz liegen. Unter Berücksichtigung dieser Umstände ist davon auszugehen, dass nur der Verzicht auf FKS einer physiologischen Hypoxie-Situation entspricht.

Die aufgeführten Ergebnisse unterscheiden sich von Beobachtungen anderer Studien. Pfeil et al. zeigten, dass eine Hypoxie von 1 % Sauerstoff über 6 Stunden zu einer vermehrten Expression von Intermedin in humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen führt. Auch in der murinen Lunge, Kardiomyozyten, Fibroblasten und Neuroblastomzellen wurde ähnlich wie bei Adrenomedullin ein Anstieg der mRNA-Expression beobachtet, wenngleich

weniger stark ausgeprägt. Pfeil et al. vermuteten, dass Intermedin vor allem die pulmonale Barrierefunktion verbessert und dem hypoxisch induzierten Lungenödem entgegenwirkt (Pfeil et al., 2009). Auch in HUVEC-Monolayer-Kulturen sorgt Intermedin für vermehrte Stabilität zwischen den Endothelzellen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Intermedin die Gefäß-permeabilität im Rahmen inflammatorischer Geschehen reduziert (Aslam et al., 2012).

Intermedin zeigt bei ischämischen Reperfusions-Schäden kardioprotektive Effekte (Yang et al., 2005). Außerdem wirkt es wie Adrenomedullin vasodilatorisch und hypotensiv (Rademaker et al., 2008).

In HEK293T-Zellen, einer humanen embryonalen Nierenzelllinie, wurden Sequenzen Hypoxie-responsibler Elemente in der Intermedin-Promotorregion nachgewiesen und eine gleichzeitige Expression von HIF-1 α beobachtet (Pfeil et al., 2009).

Im Knochenstoffwechsel wurde die Regulation von Intermedin unter Sauerstoffmangel bisher noch nicht untersucht. Allerdings ist auch hier ein Einfluss auf die Angiogenese bei der Frakturheilung oder der Tumorentstehung vorstellbar.

5.3. Ausblick

Die Expression von Adrenomedullin, Intermedin und den entsprechenden Rezeptorkomponenten in murinen ostoblastären Zellen sowie die Regulation der Peptide in humanen Osteosarkomzellen unter Sauerstoffmangel lässt darauf schließen, dass die Calcitonin-Familie in verschiedene Bereiche des Knochenstoffwechsels eingreift. Insgesamt existieren derzeit allerdings noch viele offene Fragen über ihre Bedeutung und Wirkung im Knochen.

Da Adrenomedullin und Intermedin im Rahmen einer chronischen Glukokortikoidexposition scheinbar vermindert exprimiert werden, bleibt zu klären, ob durch diesen Mechanismus eventuell auch eine Reduktion der Knochendichte mitbegründet sein könnte. Kritisch betrachtet werden muss, dass es sich bei den durchgeführten Versuchen um reine Genexpressionsmethoden handelt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit fanden noch keine Untersuchungen auf Proteinebene statt. Auch die Zellkultur stellt nur einen ersten Forschungsansatz dar. Den nächsten Schritt könnten zum Beispiel Langzeitversuche mit primären Rattenosteoblasten bilden, bevor Tiermodelle und gegebenenfalls klinische Untersuchungen folgen. Ob sich aus diesen Erkenntnissen auch therapeutische Möglichkeiten, beispielsweise im Rahmen der Osteoporosebehandlung ergeben, bleibt zu prüfen.

Auch die Ergebnisse der Hypoxieversuche könnten als Wegbereiter für weitere Untersuchungen dienen. So stellt sich die Frage, ob sich auf Grundlage solcher Experimente Möglichkeiten ergeben, wodurch die Frakturheilung beschleunigt oder die Tumorentstehung beziehungsweise -ausbreitung gehemmt werden könnte.

6. Zusammenfassung

Die Calcitonin-Familie bezeichnet eine Gruppe strukturell verwandter Peptide, die eine Vielzahl biologischer Funktionen im Körper hervorruft. Dazu gehört auch die Regulation des Knochenstoffwechsels, wodurch unter anderem die Knochenbildung gefördert wird. CGRP, Adrenomedullin und Intermedin als Mitglieder der Calcitonin-Peptid-Familie wirken über den CRLR und die sogenannten RAMPs, die Heterodimere mit diesem Rezeptor bilden. In der Lunge kommt es unter Sauerstoffmangel zu einer Hochregulation von Adrenomedullin und Intermedin. Auch im Knochen gibt es Prozesse, die unter hypoxischen Bedingungen ablaufen, wie beispielsweise die Frakturheilung oder das Tumorwachstum. Zum einen befasst sich die vorliegende Arbeit mit dem Nachweis verschiedener Komponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in murinen osteoblastären MC3T3-E1-Zellen vor und nach osteogener Differenzierung. Zum anderen wird erstmalig die Regulation von Adrenomedullin und Intermedin unter Sauerstoffmangel in humanen Osteosarkomzellen untersucht.

Mittels RT-PCR können CRLR und RAMP 1-3 sowohl in undifferenzierten als auch in osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen detektiert werden. Ein sicherer Nachweis von Adrenomedullin gelingt nur in undifferenzierten Zellen, während Intermedin teilweise auch in osteogen differenzierten Zellen vorkommt. CGRP mRNA wird in MC3T3-E1-Zellen nicht exprimiert.

Weiterhin kann in der humanen Osteosarkomzelllinie TE 85 mit Hilfe der real-time RT-PCR eine signifikante Hochregulation von Adrenomedullin unter Hypoxie nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wird Intermedin unter gleichen Bedingungen herunterreguliert.

Diskutiert wird die Minderung der Adrenomedullin und Intermedin mRNA-Expression infolge einer mehrwöchigen Dexamethasonbehandlung im Rahmen der osteogenen Differenzierung, wodurch wiederum eine Knochendichteminderung bei chronischer Glukokortikoidexposition begünstigt werden könnte.

Bekannt ist, dass Sauerstoffmangel die Angiogenese fördert. Eine HIF-1 vermittelte Regulation von Adrenomedullin und gegebenenfalls Intermedin infolge lokaler Hypoxie könnte die Frakturheilung oder aber die Entstehung von Tumoren im Knochen durch Induktion der Neovaskularisation möglicherweise vorantreiben.

7. Summary

The calcitonin family denotes a group of structurally related peptides, which cause a variety of biological functions in the body. This also includes the regulation of the bone metabolism, which promotes bone formation among others. CGRP, adrenomedullin and intermedin as members of the calcitonin peptide family function via CRLR and the so-called RAMPs, which heterodimerize with this receptor. In the lung, a lack of oxygen causes an upregulation of adrenomedullin and intermedin. Also in bone, there are processes under hypoxic conditions, for example fracture healing or tumor growth. On the one hand, this paper is concerned with detecting several components of the calcitonin peptide family in the murine osteoblastic cell line MC3T3-E1 before and after an osteogenic differentiation. On the other hand, the regulation of adrenomedullin and intermedin under a lack of oxygen in a human osteosarcoma cell line is analysed for the first time.

With the help of RT-PCR, CRLR and RAMP 1-3 can be detected both in undifferentiated and in osteogenic differentiated cells. A certain evidence of adrenomedullin only succeeds in undifferentiated cells, whereas intermedin partly appears in osteogenic differentiated cells as well. CGRP mRNA is not expressed in MC3T3-E1 cells.

Furthermore, a significant upregulation of adrenomedullin in hypoxia was shown in the human osteosarcoma cell line TE 85 with the help of the real-time RT-PCR. In contrast, intermedin is downregulated under the same conditions.

The decrease of the adrenomedullin and intermedin mRNA expression due to a dexamethason treatment for several weeks within the osteogenic differentiation is discussed, which might facilitate a reduce in bone density during chronic exposure to glucocorticoids.

It is well established that a lack of oxygen promotes angiogenesis. A HIF-1-stimulated regulation of adrenomedullin and, if applicable, intermedin due to a local hypoxia might possibly accelerate fracture healing or tumorigenesis in bone via an induction of neovascularisation.

8. Verzeichnisse

8.1. Literaturverzeichnis

- Adeghate E, Kalasz H** (2011) Amylin analogues in the treatment of diabetes mellitus: medicinal chemistry and structural basis of its function. *Open Med Chem J* **5**: 78–81
- Arnett TR, Gibbons DC, Utting JC, Orriss IR, Hoebertz A, Rosendaal M, Meghji S** (2003) Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol* **196**: 2–8
- Aslam M, Pfeil U, Gündüz D, Rafiq A, Kummer W, Piper HM, Noll T** (2012) Intermedin (adrenomedullin2) stabilizes the endothelial barrier and antagonizes thrombin-induced barrier failure in endothelial cell monolayers. *Br J Pharmacol* **165**: 208–222
- Bell D, McDermott BJ** (2008) Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**: S247–62
- Beltowski J, Jamroz A** (2004) Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* **56**: 5–27
- Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB** (1996) PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* **19**: 437–445
- Bodo M, Lilli C, Bellucci C, Carinci P, Calvitti M, Pezzetti F, Stabellini G, Bellocchio S, Balducci C, Carinci F, Baroni T** (2002) Basic Fibroblast Growth Factor Autocrine Loop Controls Human Osteosarcoma Phenotyping and Differentiation. *Mol Med* **8**: 393–404
- Born W, Muff R, Fischer JA** (2002) Functional interaction of G protein-coupled receptors of the adrenomedullin peptide family with accessory receptor-activity-modifying proteins (RAMP). *Microsc Res Tech* **57**: 14–22
- Brain SD, Grant AD** (2004) Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* **84**: 903–934
- Breimer LH, MacIntyre I, Zaidi M** (1988) Peptides from the calcitonin genes: molecular genetics, structure and function. *Biochem J* **255**: 377–390
- Chambers TJ, Magnus CJ** (1982) Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol* **136**: 27–39
- Chang CP, Pearse RVn, O'Connell S, Rosenfeld MG** (1993) Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron* **11**: 1187–1195
- Clover J, Gowen M** (1994) Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype? *Bone* **15**: 585–591
- Cooper GJ** (1994) Amylin compared with calcitonin gene-related peptide: structure, biology, and relevance to metabolic disease. *Endocr Rev* **15**: 163–201

- Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB** (1987) Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 8628–8632
- Copp DH, Cameron EC** (1961) Demonstration of a hypocalcemic factor (calcitonin) in commercial parathyroid extract. *Science* **134**: 2038
- Cornish J, Callon KE, Bava U, Kamona SA, Cooper GJ, Reid IR** (2001) Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. *Bone* **29**: 162–168
- Cornish J, Callon KE, Cooper GJ, Reid IR** (1995) Amylin stimulates osteoblast proliferation and increases mineralized bone volume in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* **207**: 133–139
- Cornish J, Callon KE, Coy DH, Jiang NY, Xiao L, Cooper GJ, Reid IR** (1997) Adrenomedullin is a potent stimulator of osteoblastic activity in vitro and in vivo. *Am J Physiol* **273**: E1113–20
- Cornish J, Callon KE, King AR, Cooper GJ, Reid IR** (1998) Systemic administration of amylin increases bone mass, linear growth, and adiposity in adult male mice. *Am J Physiol* **275**: E694–9
- Cornish J, Callon KE, Lin CQ, Xiao CL, Gamble GD, Cooper GJ, Reid IR** (1999) Comparison of the effects of calcitonin gene-related peptide and amylin on osteoblasts. *J Bone Miner Res* **14**: 1302–1309
- Eguchi S, Hirata Y, Iwasaki H, Sato K, Watanabe TX, Inui T, Nakajima K, Sakakibara S, Marumo F** (1994) Structure-activity relationship of adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* **135**: 2454–2458
- Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, Dickerson IM** (2000) CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem* **275**: 31438–31443
- Findlay DM, Sexton PM** (2004) Calcitonin. *Growth Factors* **22**: 217–224
- Fischer JA, Muff R, Born W** (2002) Functional relevance of G-protein-coupled-receptor-associated proteins, exemplified by receptor-activity-modifying proteins (RAMPs). *Biochem Soc Trans* **30**: 455–460
- Fluhmann B, Muff R, Hunziker W, Fischer JA, Born W** (1995) A human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochem Biophys Res Commun* **206**: 341–347
- Foster GV, Baghdiantz A, Kumar MA, Slack E, Soliman HA, MacIntyre I** (1964) Thyroid origin of calcitonin. *Nature* **202**: 1303–1305
- Friedman J, Raisz LG** (1965) Thyrocalcitonin: inhibitor of bone resorption in tissue culture. *Science* **150**: 1465–1467
- Garayoa M, Martinez A, Lee S, Pio R, An WG, Neckers L, Trepel J, Montuenga LM, Ryan H, Johnson R, Gassmann M, Cuttitta F** (2000) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis. *Mol Endocrinol* **14**: 848–862
- Goldring SR, Gorn AH, Yamin M, Krane SM, Wang JT** (1993) Characterization of the structural and functional properties of cloned calcitonin receptor cDNAs. *Horm Metab Res* **25**: 477–480
- Granhölm S** (2008) The Calcitonin Gene Family of Peptides: Receptor Expression and Effects on Bone Cells. Umeå University Odontological Dissertations 23–33
- Granhölm S, Henning P, Lerner UH** (2011) Comparisons between the effects of calcitonin receptor-stimulating peptide and intermedin and other peptides in the calcitonin family on bone resorption and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem* **112**: 3300–3312

- Granhölm S, Lundberg P, Lerner UH** (2008) Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* **104**: 920–933
- Harrison JS, Rameshwar P, Chang V, Bandari P** (2002) Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers. *Blood* **99**: 394
- Hoff AO, Catala-Lehnen P, Thomas PM, Priemel M, Rueger JM, Nasonkin I, Bradley A, Hughes MR, Ordonez N, Cote GJ, Amling M, Gagel RF** (2002) Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J Clin Invest* **110**: 1849–1857
- Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G** (2005) Typ-III-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelt). *Biochemie des Menschen*, Ed 3 Georg Thieme Verlag, pp 342
- Houssami S, Findlay DM, Brady CL, Martin TJ, Epand RM, Moore EE, Murayama E, Tamura T, Orlowski RC, Sexton PM** (1995) Divergent structural requirements exist for calcitonin receptor binding specificity and adenylate cyclase activation. *Mol Pharmacol* **47**: 798–809
- Huebner AK, Schinke T, Priemel M, Schilling S, Schilling AF, Emeson RB, Rueger JM, Amling M** (2006) Calcitonin deficiency in mice progressively results in high bone turnover. *J Bone Miner Res* **21**: 1924–1934
- Huppelsberg J, Walter K** (2005) Die Signaltransduktion. *Kurzlehrbuch Physiologie*, Ed 2 Georg Thieme Verlag, pp 8-10
- Hurley DL, Tiesgs RD, Wahner HW, Heath Hr** (1987) Axial and appendicular bone mineral density in patients with long-term deficiency or excess of calcitonin. *N Engl J Med* **317**: 537–541
- Irie K, Hara-Irie F, Ozawa H, Yajima T** (2002) Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve fibers in bone tissue and their involvement in bone remodeling. *Microsc Res Tech* **58**: 85–90
- Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, Eto T, Matsuo H** (1994) Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 631–639
- Jougasaki M, Wei CM, McKinley LJ, Burnett JCJ** (1995) Elevation of circulating and ventricular adrenomedullin in human congestive heart failure. *Circulation* **92**: 286–289
- Katafuchi T, Hamano K, Kikumoto K, Minamino N** (2003a) Identification of second and third calcitonin receptor-stimulating peptides in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* **308**: 445–451
- Katafuchi T, Kikumoto K, Hamano K, Kangawa K, Matsuo H, Minamino N** (2003b) Calcitonin receptor-stimulating peptide, a new member of the calcitonin gene-related peptide family. Its isolation from porcine brain, structure, tissue distribution, and biological activity. *J Biol Chem* **278**: 12046–12054
- Katafuchi T, Minamino N** (2004) Structure and biological properties of three calcitonin receptor-stimulating peptides, novel members of the calcitonin gene-related peptide family. *Peptides* **25**: 2039–2045
- Katafuchi T, Yasue H, Osaki T, Minamino N** (2009) Calcitonin receptor-stimulating peptide: Its evolutionary and functional relationship with calcitonin/calcitonin gene-related peptide based on gene structure. *Peptides* **30**: 1753–1762
- Kato H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y** (1997) Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology* **138**: 2615–2620
- Keller JH** (2010) Die Rolle von Calcitonin und seines Rezeptors im Knochenstoffwechsel - Untersuchungen an gentechnisch modifizierten Mausmodellen. Institut für Osteologie und Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf 14–21

- Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ** (2008) Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest* **118**: 421–428
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T** (1993a) Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 553–560
- Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T** (1993b) Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* **194**: 720–725
- Kobayashi K, Kitamura K, Hirayama N, Date H, Kashiwagi T, Ikushima I, Hanada Y, Nagatomo Y, Takenaga M, Ishikawa T, Imamura T, Koiwaya Y, Eto T** (1996) Increased plasma adrenomedullin in acute myocardial infarction. *Am Heart J* **131**: 676–680
- Kohno M, Hanehira T, Hirata K, Kawaguchi T, Okishio K, Kano H, Kanazawa H, Yoshikawa J** (1996) An accelerated increase of plasma adrenomedullin in acute asthma. *Metabolism* **45**: 1323–1325
- Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F** (2011) Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clin Orthop Relat Res* **469**: 3118–3126
- Kruskal WH, Wallis WA** (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Amer Statist Assoc* **47**: 583–621
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ** (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**: 165–176
- Lerner UH** (2006) Deletions of genes encoding calcitonin/alpha-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **6**: 87–95
- Lerner UH, Persson E** (2008) Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **8**: 154–165
- Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE** (1999) Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol* **66**: 889–900
- Li J, Kreicbergs A, Bergstrom J, Stark A, Ahmed M** (2007) Site-specific CGRP innervation coincides with bone formation during fracture healing and modeling: A study in rat angulated tibia. *J Orthop Res* **25**: 1204–1212
- Lin Chang C, Roh J, Park JI, Klein C, Cushman N, Haberberger RV, Hsu SY** (2005) Intermedin functions as a pituitary paracrine factor regulating prolactin release. *Mol Endocrinol* **19**: 2824–2838
- Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, Kolakowski LFJ, Lodish HF, Goldring SR** (1991) Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science* **254**: 1022–1024
- Luebke AE, Dahl GP, Roos BA, Dickerson IM** (1996) Identification of a protein that confers calcitonin gene-related peptide responsiveness to oocytes by using a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 3455–3460
- Mann HB, Whitney DR** (1947) On a test of whether one of 2 random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist* **18**: 50–60
- McAllister RM, Gardner MB, Greene AE, Bradt C, Nichols WW, Landing BH** (1971) Cultivation in vitro of cells derived from a human osteosarcoma. *Cancer* **27**: 397–402

- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM** (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**: 333–339
- Morfis M, Christopoulos A, Sexton PM** (2003) RAMPs: 5 years on, where to now? *Trends Pharmacol Sci* **24**: 596–601
- Nakamura M, Morimoto S, Yang Q, Hisamatsu T, Hanai N, Nakamura Y, Mori I, Kakudo K** (2005) Osteoclast-like cells express receptor activity modifying protein 2: application of laser capture microdissection. *J Mol Endocrinol* **34**: 257–261
- Naot D, Callon KE, Grey A, Cooper GJ, Reid IR, Cornish J** (2001) A potential role for adrenomedullin as a local regulator of bone growth. *Endocrinology* **142**: 1849–1857
- Naot D, Cornish J** (2008) The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone* **43**: 813–818
- Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ** (1986) Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest* **78**: 355–360
- Nikitenko LL, Smith DM, Bicknell R, Rees MC** (2003) Transcriptional regulation of the CRLR gene in human microvascular endothelial cells by hypoxia. *FASEB J* **17**: 1499–1501
- Nikitenko LL, Smith DM, Hague S, Wilson CR, Bicknell R, Rees MC** (2002) Adrenomedullin and the microvasculature. *Trends Pharmacol Sci* **23**: 101–103
- Njuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, Legon S** (1993) A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin Sci (Lond)* **85**: 385–388
- Notoya M, Arai R, Katafuchi T, Minamino N, Hagiwara H** (2007) A novel member of the calcitonin gene-related peptide family, calcitonin receptor-stimulating peptide, inhibits the formation and activity of osteoclasts. *Eur J Pharmacol* **560**: 234–239
- Ogita T, Hashimoto E, Yamasaki M, Nakaoka T, Matsuoka R, Kira Y, Fujita T** (2001) Hypoxic induction of adrenomedullin in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Hypertens* **19**: 603–608
- Ogoshi M, Inoue K, Takei Y** (2003) Identification of a novel adrenomedullin gene family in teleost fish. *Biochem Biophys Res Commun* **311**: 1072–1077
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45
- Pfeil U, Aslam M, Paddenberg R, Quanz K, Chang CL, Park JI, Gries B, Rafiq A, Faulhammer P, Goldenberg A, Papadakis T, Noll T, Hsu SY, Weissmann N, Kummer W** (2009) Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**: L837–45
- Pio R, Martinez A, Unsworth EJ, Kowalak JA, Bengoechea JA, Zipfel PF, Elsasser TH, Cuttitta F** (2001) Complement factor H is a serum-binding protein for adrenomedullin, and the resulting complex modulates the bioactivities of both partners. *J Biol Chem* **276**: 12292–12300
- Pondel M** (2000) Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *Int J Exp Pathol* **81**: 405–422
- Prado MA, Evans-Bain B, Dickerson IM** (2002) Receptor component protein (RCP): a member of a multi-protein complex required for G-protein-coupled signal transduction. *Biochem Soc Trans* **30**: 460–464

- Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ** (1992) Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* **7**: 683–692
- Raddant AC, Russo AF** (2011) Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation. *Expert Rev Mol Med* **13**: e36
- Rademaker MT, Charles CJ, Nicholls MG, Richards AM** (2008) Hemodynamic, hormonal, and renal actions of adrenomedullin 2 in experimental heart failure. *Circ Heart Fail* **1**: 134–142
- Rakopoulos M, Ikegame M, Findlay DM, Martin TJ, Moseley JM** (1995) Short treatment of osteoclasts in bone marrow culture with calcitonin causes prolonged suppression of calcitonin receptor mRNA. *Bone* **17**: 447–453
- Ren YS, Yang JH, Zhang J, Pan CS, Yang J, Zhao J, Pang YZ, Tang CS, Qi YF** (2006) Intermedin 1-53 in central nervous system elevates arterial blood pressure in rats. *Peptides* **27**: 74–79
- Riediger T, Rauch M, Schmid HA** (1999) Actions of amylin on subfornical organ neurons and on drinking behavior in rats. *Am J Physiol* **276**: R514–21
- Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY** (2004) Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* **279**: 7264–7274
- Rosenfeld MG, Amara SG, Roos BA, Ong ES, Evans RM** (1981) Altered expression of the calcitonin gene associated with RNA polymorphism. *Nature* **290**: 63–65
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM** (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* **304**: 129–135
- Schinke T, Liese S, Priemel M, Haberland M, Schilling AF, Catala-Lehnen P, Blicharski D, Rueger JM, Gagel RF, Emeson RB, Amling M** (2004) Decreased bone formation and osteopenia in mice lacking alpha-calcitonin gene-related peptide. *J Bone Miner Res* **19**: 2049–2056
- Sexton PM, Paxinos G, Kenney MA, Wookey PJ, Beaumont K** (1994) In vitro autoradiographic localization of amylin binding sites in rat brain. *Neuroscience* **62**: 553–567
- Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Chin G, Dudziak ME, Gerrets RP, Gittes GK, Longaker MT** (1999) Hypoxia regulates VEGF expression and cellular proliferation by osteoblasts in vitro. *Plast Reconstr Surg* **104**: 738–747
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FVJ, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH** (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 9656–9661
- Suda T, Kobayashi K, Jimi E, Udagawa N, Takahashi N** (2001) The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp* **232**: 235–250
- Suda T, Takahashi N, Martin TJ** (1992) Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* **13**: 66–80
- Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S** (1983) In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* **96**: 191–198

- Takahashi K, Kikuchi K, Maruyama Y, Urabe T, Nakajima K, Sasano H, Imai Y, Murakami O, Totsune K** (2006) Immunocytochemical localization of adrenomedullin 2/intermedin-like immunoreactivity in human hypothalamus, heart and kidney. *Peptides* **27**: 1383–1389
- Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A, Suda T** (1988) Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* **122**: 1373–1382
- Tauber SD** (1967) The ultimobranchial origin of thyrocalcitonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**: 1684–1687
- Taylor MM, Bagley SL, Samson WK** (2005) Intermedin/adrenomedullin-2 acts within central nervous system to elevate blood pressure and inhibit food and water intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**: R919–27
- Utting JC, Robins SP, Brandao-Burch A, Orriss IR, Behar J, Arnett TR** (2006) Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp Cell Res* **312**: 1693–1702
- Uzan B, de Vernejoul MC, Cressent M** (2004) RAMPs and CRLR expressions in osteoblastic cells after dexamethasone treatment. *Biochem Biophys Res Commun* **321**: 802–808
- Welsch U** (2006a) C-Zellen. *Lehrbuch Histologie*, Ed 2 Elsevier, pp 426
- Welsch U** (2006b) Knochengewebe. *Lehrbuch Histologie*, Elsevier, pp 131–151
- Westermarck P, Andersson A, Westermarck GT** (2011) Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev* **91**: 795–826
- Westermarck P, Wernstedt C, Wilander E, Sletten K** (1986) A novel peptide in the calcitonin gene related peptide family as an amyloid fibril protein in the endocrine pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* **140**: 827–831
- Wimalawansa SJ** (1997) Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* **11**: 167–239
- Yang JH, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Ouyang M, Yang J, Chang JK, Tang CS, Qi YF** (2005) Effects of intermedin(1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 713–719
- Zaidi M, Breimer LH, MacIntyre I** (1987) Biology of peptides from the calcitonin genes. *Q J Exp Physiol* **72**: 371–408

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Peptidstruktur des humanen Calcitoninmoleküls
Abb. 2a:	Calcitonin mRNA mit codierendem CALCA-Gen
Abb. 2b:	α CGRP mRNA mit codierendem CALCA-Gen
Abb. 3:	Peptidstruktur des humanen Adrenomedullinmoleküls
Abb. 4:	Peptidstruktur des humanen Intermedinmoleküls
Abb. 5:	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Abb. 6:	Signaltransduktion über die Adenylatcyclase
Abb. 7:	Signaltransduktion über die Phospholipase C
Abb. 8:	Undifferenzierte MC3T3-E1-Zellen
Abb. 9:	Differenzierte MC3T3-E1-Zellen nach Kultivierung in osteogenem Medium
Abb. 10:	Zellen der undifferenzierten TE 85-Zelllinie
Abb. 11:	Versuchsaufbau Normoxie versus Hypoxie
Abb. 12a:	Standardgerade MG
Abb. 12b:	Schmelzkurve MG
Abb. 13a:	Standardgerade Adrenomedullin
Abb. 13b:	Schmelzkurve Adrenomedullin
Abb. 14a:	Standardgerade Intermedin
Abb. 14b:	Schmelzkurve Intermedin
Abb. 15:	Expression von Einzelkomponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in undifferenzierten MC3T3-E1-Zellen
Abb. 16:	Expression von Einzelkomponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen
Abb. 17:	Positivkontrollen, Expression von Einzelkomponenten der Calcitonin-Peptid-Familie in verschiedenen Gewebetypen der Maus.
Abb. 18:	Boxplot des statistischen Vergleichs von dCT-Werten der Adrenomedullin mRNA-Expression in TE 85-Zellen
Abb. 19:	Boxplot des statistischen Vergleichs von dCT-Werten der Intermedin mRNA-Expression in TE 85-Zellen

8.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Rezeptoren der Calcitonin-Peptid-Familie mit Rezeptorkomponenten und Liganden
Tab. 2:	Verwendete Primer für die RT-PCR mit MC3T3-E1-Zellen
Tab. 3:	Verwendete Primer für die qualitative RT-PCR und real-time RT-PCR mit TE 85-Zellen
Tab. 4:	Ergebnisse der qualitativen RT-PCR in undifferenzierten und osteogen differenzierten MC3T3-E1-Zellen
Tab. 5:	Berechnete dCT-Werte für Adrenomedullin
Tab. 6:	Berechnete dCT-Werte für Intermedin

8.4. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalischer Phosphatase
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRLR	Calcitonin Receptor-Like Receptor
CRSP	Calcitonin-Receptor-Stimulating Peptides
Ct-Wert	cycle threshold
CTR	Calcitoninrezeptor
DAG	Diacylglycerin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCt-Wert	deltaCt-Wert
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotide triphosphate
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxytyrosintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetacid
FKS	Fötales Kälberserum
fw	forward primer
G-Protein	Gunanyukleotid-bindendes Protein
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GDP	Guanosindiphosphat
G _i -Protein	inhibitorisches G-Protein
G _q -Protein	Phospholipase C gekoppeltes G-Protein
G _s -Protein	stimulierendes G-Protein, cAMP-abhängig
GTP	Guanosintriphosphat
HIF-1	Hypoxie-induzierten Faktor-1
HOS	humane Osteosarkomzellen (entspricht TE 85)
HUVEC	Humanen Endothelzellen der Umbilikalvene

IAPP	Islet Amyloid Polypeptide
IP ₃	Inositol-Triphosphat
M	molar
M-CFS	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MG	Beta-2-Mikroglobulin
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
OPN	Osteopontin
PAMP	Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide
PBS- Puffer	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RAMP	Receptor Activity Modifying Protein
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand
RCP	Receptor Component Protein
rev	reverse primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAP	Tartrate-resistente saure Phosphatase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Faktor
αCGRP	alphaCalcitonin Gene-Related Peptide
β-Zellen	Betazellen
βCGRP	betaCalcitonin Gene-Related Peptide
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Anmerkung: Die verwendeten Abkürzungen „RLT“, „RW1“ und „RPE“ stammen von der Firma Qiagen GmbH, Hilden. Die Bedeutung dieser Eigennamen ist nicht bekannt.

9. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt oder indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit einer Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware beziehungsweise ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Bad Hersfeld, März 2013

Constanze Schmidmeier

10. Danksagung

Hiermit möchte ich allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen danken, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite standen.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Prof. h.c. Dr. Dr. Dr. h.c. Reinhard Schnettler, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Möglichkeit, diese Dissertation im Labor für Experimentelle Unfallchirurgie vollenden zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, die hervorragende persönliche Betreuung und Hilfestellung während der gesamten Zeit sowie die kritische Durchsicht meines Manuskripts.

Weiterhin möchte ich mich herzlichst bei Frau Dipl. Biol. Sonja Hartmann für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der PCR-Versuche und ihre zahlreichen guten Ratschläge und ausführlichen Erklärungen bedanken. An dieser Stelle danke ich auch Herrn Dr. Uwe Pfeil aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie für das Primerdesign.

Außerdem danke ich Frau Dr. med. vet. Katja Trinkaus und Frau Ida Oberst, die mir insbesondere bei der Zellkultivierung viel halfen und mich – ebenso wie Herr Rainer Braun und Frau Iris Schütz – bei der Bewältigung alltäglicher Laborprobleme stets sehr unterstützten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6094-7

